



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EFEECTO DE LA APLICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS HUMICAS MEDIANTE LA BIOSOLUBILIZACION DE CARBON DE BAJO RANGO EN UN SUELO SALINO-SÓDICO EN EL VALLE DEL CESAR

JUAN GUILLERMO CUBILLOS HINOJOSA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Posgrados
Maestría en Ciencias Agrarias – Suelos y Aguas
Bogotá D.C., Colombia
2014

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS HUMICAS MEDIANTE LA BIOSOLUBILIZACION DE CARBON DE BAJO RANGO EN UN SUELO SALINO-SÓDICO EN EL VALLE DEL CESAR

JUAN GUILLERMO CUBILLOS HINOJOSA

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial
para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director:

PhD., Nelson Osvaldo Valero Valero

Codirectora:

PhD., Luz Marina Melgarejo Muñoz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Posgrados

Maestría en Ciencias Agrarias – Suelos y Aguas

Bogotá D.C., Colombia

2014

A Dios, por ser mi ayudador y fiel amigo,
el dador de sueños que camina conmigo
día tras día para darme de su amor inagotable.

A mis padres, quienes con su amor y lucha
me motivan a seguir adelante.

A mis hermanos y mi prima Mariapaz,
quienes a través de mi vida
han estado conmigo brindándome su cariño.

A mi sobrina Laura Sofía, quien nació
para darme su mágica sonrisa y ser motivo
de mi inspiración.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial a la facultad de ciencias agrarias y sus profesores por haberme acogido y formado como Magister.

A la Universidad Popular del Cesar por la cofinanciación de esta investigación.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS por el apoyo brindado en la beca como joven investigador 2011-2012.

Al Centro Nacional de Hotelería, Turismo y Alimentos del SENA Regional Distrito Capital, en especial a la subdirectora Adriana Milena Gasca y a mis aprendices por el apoyo brindado para la realización de mis estudios.

Al Centro Biotecnológico del Caribe del SENA Regional Cesar por abrirme las puertas y prestarme sus instalaciones para la ejecución de esta investigación y a los aprendices técnicos en mecanización agrícola por su disposición y apoyo.

Al grupo de investigación en Microbiología Agrícola y Ambiental - MAGYA de la Universidad Popular del Cesar y sus integrantes por el apoyo incondicional brindado.

Al grupo de Investigación Fisiología del estrés y biodiversidad en plantas y microorganismos de la Universidad Nacional de Colombia por haberme acogido como joven investigador para la realización de esta investigación.

Al profesor Nelson Valero por su dedicación a guiarme en mi carrera profesional, como persona y ser un ejemplo a seguir.

A la profesora Luz Marina Melgarejo, por su orientación y colaboración incondicional.

Al profesor Arnaldo Peralta por su disposición a asesorarme en el análisis estadístico.

A la profesora Yolanda Rubiano por su ayuda y asesoría en la clasificación del suelo.

A Liliana Gómez, Manuel Pantoja y Elizabeth Rojas por su apoyo y consejos.

A Daissy Mejía por su disposición y colaboración.

A Jenny Mayorga por su colaboración y siempre estar dispuesta a brindarme su mano.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE SUSTANCIAS HUMICAS MEDIANTE LA BIOSOLUBILIZACION DE CARBON DE BAJO RANGO EN UN SUELO SALINO-SÓDICO EN EL VALLE DEL CESAR

Resumen

La salinidad es un problema de degradación que es común en los suelos del Valle del Cesar y el departamento de la Guajira debido a la susceptibilidad que presentan por la presencia de sales y sodio elevados lo que afecta la productividad de los cultivos. Como alternativa para el manejo de la salinidad de los suelos se ha utilizado la aplicación de enmiendas orgánicas que permitan generar cambios favorables en las propiedades del suelo. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del carbón de bajo rango (CBR) y las bacterias solubilizadoras de carbón (BSC) *Bacillus mycoides*, *Microbacterium* sp y *Acinetobacter baumannii* sobre algunas propiedades químicas, biológicas y físicas de un suelo Salidic Calciustolls en el Valle del Cesar. Para ello se realizaron dos experimentos: uno en condiciones de invernadero y otro en campo que permitiera observar en un contexto real el efecto del CBR y las BSC. Como variables de respuesta se determinó la respiración del suelo, la actividad microbiológica mediante la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF), la actividad de enzimas ligninolíticas relacionadas con la biotransformación del carbón mediada por microorganismos. En complemento, se evaluaron algunas variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo y la densidad aparente. Se encontró que el tratamiento del suelo con CBR al 1% bajo condiciones de invernadero favorece la actividad biológica, la cual se vio reflejada en el incremento de la respiración del suelo, la actividad de enzimas hidrolíticas sobre el DAF, la actividad de las enzimas lignino peroxidasas (LiP) y lacasas (Lac) asociadas a la biotransformación de CBR; también incrementó la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y se registró una disminución en algunos parámetros químicos del suelo. En condiciones de campo la adición de CBR a razón de 5 kg de CBR/m² contribuyó a disminuir la conductividad eléctrica (C.E.), la razón de absorción de sodio (RAS) y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI); no se encontraron cambios significativos sobre el pH y la densidad aparente. En relación a los parámetros de actividad biológica se registraron incrementos en la respiración, la actividad microbiológica y la actividad de las enzimas LiP, manganeso peroxidasa (MnP) y Lac; también se observó incrementos en la CIC. Los resultados de los dos experimentos muestran que hay un mayor efecto sobre las propiedades químicas y biológicas del suelo cuando se aplica el CBR en conjunto con las BSC, lo cual sugiere la posibilidad de utilizar y aprovechar el CBR como material orgánico humificado para el manejo de los suelos afectados por salinidad en el área de influencia de la minería del carbón en el Valle del Cesar, con ayuda de la microbiota que como se ha demostrado actúa sobre el CBR liberando la materia orgánica humificada.

Palabras clave: solubilización de carbon, salinidad de suelos, sustancias húmicas.

EFFECT OF THE APPLICATION OF BACTERIA PRODUCERS OF HUMIC SUBSTANCES BY BIOSOLUBILIZACION LOW RANK COAL IN A SALINE SOIL - SODIUM IN THE VALLEY OF CESAR

Abstract

Salinity is a problem of degradation that is common in the soils of the Valley of Cesar and Guajira Department due to susceptibility presented by the presence of salts and high sodium that affects crop productivity. As an alternative for the management of soil salinity has used the application of organic amendments that will generate favorable changes in soil properties. Therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of low-rank coal (LRC) and coal-solubilizing bacteria (CSB) *Bacillus mycoides*, *Microbacterium* sp and *Acinetobacter baumannii* on chemical, biological and physical properties of a soil Salidic Calciustolls Valley of Cesar. For this, two experiments were performed: one in the greenhouse and one field that would be observed in a real context the effect of CBR and the BSC. As response variables soil respiration, microbiological activity by hydrolysis of fluorescein diacetate (DAF), ligninolytic activity related enzymes mediated biotransformation microorganisms coal were determined. In complement, some chemical variables associated with sodium soil salinity and bulk density were evaluated. It was found that treating the soil with LRC 1% under greenhouse conditions favors the biological activity, which was reflected in the increase in soil respiration activity of hydrolytic enzymes on the DAF, activity of enzymes lignin peroxidases (LiP) and laccase (Lac) associated with the biotransformation of LRC; also increased cationic exchange capacity (CEC) and a decrease was registered in some chemical soil parameters. Under field conditions the addition of LRC to reason 5 kg LRC/m² contributed to decrease the electrical conductivity (EC), the sodium absorption ratio (SAR) and exchangeable sodium percentage (ESP); no significant change on the pH and the bulk density were found. In relation to the parameters of biological activity increases in respiration, microbiological activity and LiP enzymes, manganese peroxidase (MnP) and Lac activity were recorded; increases were also observed in the CEC. The results of the two experiments show that there is a greater effect on chemical and biological soil properties when the LRC is applied in conjunction with the CSB, which suggests the possibility to use and exploit the LRC as humified organic material for handling soils affected by salinity in the area of influence of coal mining in the Valle del Cesar, with the help of the microorganism as demonstrated acts on the LRC releasing the humified organic matter.

Keywords: coal solubilization, soil salinity, humic substances.

Contenido

Resumen.....	V
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	X
Lista de Abreviaturas.....	XI
Introducción.....	13
1. Efecto de la aplicación de bacterias generadoras de sustancias húmicas mediante biosolubilización de carbón de bajo rango en un suelo salino-sódico...	16
1.1 Resumen.....	16
1.2 Introducción.....	17
1.3 Materiales y métodos.....	19
1.3.1 Muestras de carbón	19
1.3.2 Bacterias solubilizadoras de carbón (BSC)	20
1.3.3 Muestras de suelo	20
1.3.4 Ensayo en invernadero	20
1.4 Resultados y discusión	22
1.4.1 Respiración de suelo	22
1.4.2 Actividad microbiológica	23
1.4.3 Actividad de las enzimas LiP y Lac	24
1.4.4 Variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo	26
1.4.5 Capacidad de intercambio catiónico	26
1.5 Conclusiones	29
2. Evaluación de la aplicación de carbón de bajo rango y bacterias solubilizadoras de carbón en un suelo Salidic Calciustolls en el Valle del Cesar	30
2.1 Resumen.....	30
2.2 Introducción.....	30
2.3 Materiales y métodos.....	32
2.3.1 Muestras de carbón	32
2.3.2 Bacterias solubilizadoras de carbón (BSC)	33
2.3.3 Clasificación taxonómica del suelo	33
2.3.4 Ensayo en campo	33
2.4 Resultados y discusión	35
2.4.1 Clasificación taxonómica del suelo	35

2.4.2 Respiración del suelo	36
2.4.3 Actividad microbiológica	37
2.4.4 Actividad de las enzimas ligninolíticas Lip, MnP y Lac	38
2.4.5 Variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo	39
2.4.6 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico	40
2.5 Conclusiones	42
3. Conclusiones y recomendaciones	43
3.1 Conclusiones	43
3.2 Recomendaciones	43
Anexo A. Descripción del suelo salino sódico	44
Anexo B. Resultados del análisis granulométrico del suelo Salidic Calciustolls	47
Anexo C. Resultados del análisis químico en pasta de saturación del suelo Salidic Calciustolls	48
Anexo D. Resultados del análisis mineralógicos del suelo Salidic Calciustolls	49
Bibliografía.....	50

Lista de Figuras

Figura 1.	Respiración del suelo Salidic Calciustolls a los 2, 4 y 6 meses después de la aplicación de CBR y Bacterias productoras de SH (BSC). n=3	23
Figura 2.	Actividad de las enzimas ligninolíticas LiP y Lac (UI/g Suelo) en el tratamiento de un suelo Salidic Calciustolls con CBR y BSC. n=3	25
Figura 3.	Análisis (CATPCA). Asociación de las variables evaluadas en un suelo Salidic Calciustolls tratado con la adición de CBR y BSC en invernadero	28
Figura 4.	Respiración del suelo Salidic Calciustolls tratado con CBR y BSC en condiciones de campo. n=3	36
Figura 5.	Actividad de las enzimas lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas (Lac) en un suelo Salidic Calciustolls (UI/g Suelo) bajo condiciones de campo. n=3	38
Figura 6.	Análisis (CATPCA). Asociación de las variables evaluadas en el suelo Salidic Calciustoll tratado con la adición de CBR y BSC en condiciones de campo.	41
Figura 7.	Perfil del suelo Salidic calciustolls	46

Lista de tablas

Tabla 1.	Tratamientos utilizados en el experimento en condiciones de invernadero. *Pool: mezcla de <i>Microbacterium</i> sp., <i>B. mycoides</i> , <i>A. baumannii</i> a razón de 1×10^8 bacterias.mL ⁻¹ .g CBR ⁻¹ . Cada tratamiento n=3	21
Tabla 2.	Actividad microbiológica (mg.kg Suelo ⁻¹ .h ⁻¹) del suelo Salidic Calciustolls a los 2, 4 y 6 meses de haber sido tratado con la adición de CBR y bacterias productoras de SH. n=3.....	24
Tabla 3.	Determinación de las variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo posterior a la aplicación de CBR y bacterias productoras de SH. n=3. Conductividad eléctrica (CE), Relación adsorción de sodio (RAS), Porcentaje de saturación de Sodio (PSI).....	26
Tabla 4.	Determinación de la CIC en el suelo Salidic Calciustolls tras ser tratado con CBR y las BSC bajo condiciones de invernadero. n=3...	27
Tabla 5.	Tratamientos del montaje experimental en campo. *Pool: <i>Microbacterium</i> sp., <i>B. mycoides</i> , <i>A. baumannii</i> . n=3.....	34
Tabla 6.	Actividad microbiológica (mg.kg Suelo ⁻¹ .h ⁻¹) del suelo Salidic Calciustolls a los 2, 4 y 6 meses de haber sido tratado con la adición de CBR y bacterias productoras de SH. Condiciones de campo. n=3	37
Tabla 7.	Respuesta de las variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo y la densidad aparente (Da) del suelo salino-sódico al ser tratado con CBR y BSC bajo condiciones de campo. n=3 Conductividad eléctrica (CE), Relación adsorción de sodio (RAS), Porcentaje de saturación de Sodio (PSI).....	40
Tabla 8.	Determinación de la CIC en el suelo Salidic Calciustolls tras ser tratado con CBR y las BSC en condiciones de campo. n=3.....	40

Lista de abreviaturas

Abreviatura

ABTS

BSC

CATPTA

CBR

CE

CO

CIC

DAF

IHSS

IGAC

pH

PSI

LiP

MnP

RAS

SH

SPSS

Término

Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

Bacterias solubilizadoras de carbón

CATEgorical Principal Components Analysis

Carbón de bajo rango

Conductividad eléctrica

Carbono orgánico

Capacidad de intercambio catiónico

Fluorescein Dyacetate

International Humic Substances Society

Instituto Geográfico Agustín Codazzi

Potencial hidrógeno

Porcentaje de sodio intercambiable

Lignino peroxidasa

Manganeso peroxidasa

Razón de absorción de sodio

Sustancias húmicas

Statistical Package for the Social Sciences

Símbolo

bacterias.mL⁻¹

°C

cmol(+)/kg

dS/m

g

g.L⁻¹Kcal.kg⁻¹

kg

M

mgCO₂.m².dia⁻¹

mM

mmol

mmol/dm³

mmol/L

nm

n

N

Ppm

pH

rpm

UI

Término

Bacterias por mililitro

Grados centígrados

Centimoles de carga positiva / kilogramo

Decisiemens/metro

Gramos

Gramos por litro

Kilo calorías por kilogramo

kilogramo

Molar

Miligramos de dióxido de carbono por metro cuadrado por día

Milimolar

Milmol

Milimoles / decímetro cubico

Milimol / litro

Nanómetro

Repeticiones

Normalidad

Partes por millón

Potencial de hidrogeno

Revoluciones por minuto

Unidad internacional

Símbolo	con letras	Término
---------	------------	---------

griegas

μm

Micrómetro

μL

Micrólitro

Introducción

La salinidad se ha convertido en un gran problema de degradación del suelo a nivel mundial y ha cobrado importancia en los últimos años. La salinización de los suelos surge como resultado no solamente de factores climáticos, topográficos, hidrológicos (Gómez, 2004), sino también de factores antrópicos por la larga tradición de la agricultura y ganadería intensiva y extensiva, con prácticas inadecuadas de manejo, lo que ha conllevado a procesos de degradación de los suelos por aumento de la dispersión de la sales, la compactación y erosión del suelo.

Los suelos salinos son aquellos que presentan un alto contenido de sales y se caracterizan por desarrollar una vegetación escasa, costras blancas de sales en su superficie y poseer un pH alto. Los efectos de la salinidad se pueden agrupar desde tres puntos de vista (Dorronsoro, 2001): en primer lugar las relaciones hídricas debido a que la concentración de sales solubles eleva la presión osmótica de la solución de suelo por la retención del agua, impidiendo que esta sea absorbida por la raíces ocasionando estrés hídrico en las plantas (Clavero y Razz, 2002); en segundo lugar el balance de energético debido a que las plantas al aumentar la presión osmótica se ven obligadas a una adaptación osmótica de sus células para poder seguir absorbiendo agua, demandando un alto consumo de energía, afectando la división celular y limitando el crecimiento vegetal; y por último la nutrición ya que la dominancia de calcio genera antagonismo sobre el potasio, magnesio, hierro, boro y zinc, entre otros. La sodicidad o alcalinización se desarrolla cuando en la solución del suelo existe una concentración elevada de sales sódicas capaces de sufrir hidrólisis alcalina, de tipo carbonato y bicarbonato de sodio. Las arcillas saturadas en sodio tienen propiedades particulares en presencia de agua lluvia, por tanto con el CO₂ disuelto, se hidrolizan liberando Na⁺ y OH⁻ ocasionando alcalinización del medio, alcanzando pH altos de 9-10 (Otero *et al.*, 2002).

La alcalinización genera consecuencias desfavorables en el suelo, debido a que el sodio ocasiona dispersión de las arcillas contribuyendo a la degradación de la estructura del suelo; esto conlleva a la compactación por la pérdida del espacio poroso del suelo al dispersarse las arcillas y romperse los agregados de suelo por que estos quedan reducidos a polvo. Las raíces de las plantas en un suelo poco estructurado tiene problemas de aireación y una pobre e insuficiente disponibilidad de agua (Goykovic y Saavedra del Real, 2002). Adicionalmente, la presencia de sodio causa toxicidad en el metabolismo y nutrición de las plantas debida a los carbonatos y bicarbonatos sódicos.

Los suelos susceptibles a la salinización en Colombia abarcan una extensión de 63.900 km² que corresponden a áreas salino/sódicas, de los cuales 31.770 km² son áreas con alto grado de intensidad de salinización y normalmente se encuentran en el ecosistema seco de la región Caribe y en los valles interandinos del Magdalena y Cauca, lo cual limita su uso agropecuario. Las zonas susceptibles a la salinización en Colombia normalmente se encuentran en el ecosistema seco de la región Caribe, en los valles interandinos del Magdalena y Cauca, altiplanos y en general región Caribe y Pacífica. En el departamento

del Cesar el 38, 44% de los suelos se caracterizan por ser salinos y salinos-sódicos (Otero *et al.*, 2004),

La materia orgánica desde tiempos remotos y hasta la actualidad no solo se ha utilizado para incrementar la fertilidad del suelo sino también para aumentar la productividad de los cultivos, la rehabilitación y protección del suelo frente a problemas de degradación, erosión, contaminación, y desertificación. En consecuencia, la necesidad para cultivar o aumentar la producción de los cultivos en suelos pobres en materia orgánica, ya sea intrínsecamente o por pérdida de la misma, ha llevado a la necesidad de proteger al suelo frente a la degradación, conllevando a una serie de prácticas que buscan restablecer o mejorar el contenido de materia orgánica y sus funciones (Senesi *et al.*, 2007). Una de las prácticas más populares es la aplicación de enmiendas orgánicas ricas en sustancias húmicas (SH), las cuales son utilizadas como abonos de origen natural, como acondicionadores de suelos, como mejoradores de la estructura de los agregados, estimuladores del crecimiento y desarrollo vegetal, como coadyuvantes en procesos de fitorremediación de suelos contaminados y suelos compactados por salinidad y manejo (Piccolo & Mbagwu, 1999; Nardi *et al.*, 2002; Christanis *et al.*, 2006, Bandeira *et al.*, 2009).

En ese sentido, la explotación minera de carbón a cielo abierto en los departamento del Cesar y La Guajira genera carbones de bajo rango (CBR) en donde el proceso de carbonificación fue incompleto; estos materiales por su bajo poder calorífico y alta humedad son considerados residuos o subproductos de la minería de carbón, considerándose de baja calidad por la limitación de su uso para la generación térmica. Sin embargo, presentan en su macroestructura un alto contenido de SH (Peña, 2005, Gianoulli *et al.*, 2009) y teniendo en cuenta que las SH han sido importantes para la agricultura orgánica, el CBR se podría aprovechar como materia prima para la extracción de SH.

La extracción de las sustancias húmicas se realiza mediante el método químico (Senesi *et al.*, 2007; Chassapis y Roulia, 2008); sin embargo, se ha estudiado en los últimos años la biotransformación del CBR mediado por microorganismos para la obtención de SH. Los mecanismos de biotransformación mas estudiados han sido la de los hongos mediante la actividad de las enzimas ligninolíticas extracelulares, esterases, agentes quelantes, surfactantes y sustancias alcalinas (Hofrichter y Fakoussa, 2004), pero no ha sido posible el desarrollo de procesos de biotransformación de CBR con fines biotecnológicos debido a que los hongos tras un proceso de solubilización de CBR depolimerizan las SH liberadas (Hofrichter y Fritsche, 1997), conllevando a la pérdida de la conformación supramolecular de las SH, lo que disminuye el efecto de estas sobre las propiedades del suelo (Grinhunt *et al.*, 2007). Por tanto, como una alternativa se ha estudiado la solubilización de carbón por bacterias que utilizan mecanismos no enzimáticos como la producción de agentes quelantes, surfactantes y sustancias alcalinas (Hofrichter y Fakoussa, 2004). Valero *et al.*, 2012 aisló las bacterias solubilizadoras de carbón (BSC) *Bacillus mycoides*, *Acinetobacter baumannii* y *Microbacterium* sp. a partir de sedimentos carbón, la rizósfera de gramíneas que crecen en suelos con residuos de carbón y de CBR las cuales presentaron capacidad de solubilizar CBR en medio líquido y sólido al ser utilizado como única fuente de carbono y producir SH hasta 1500mg.L⁻¹.

Bajo el anterior contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de aplicación de CBR y las bacterias solubilizadoras de carbón (BSC) *Bacillus mycoides*, *Acinetobacter baumannii* y *Microbacterium* sp. en un suelo salino sódico en el Valle del Cesar, partiendo de la hipótesis que al adicionar CBR en el suelo salino sódico puede actuar como materia orgánica humificada, dando lugar a la liberación de SH acelerado por aplicación conjunta bacterias nativas con capacidad solubilizar CBR entre un 25 y 38%. Para alcanzar el objetivo general se planteó un experimento exploratorio en invernadero y otro en campo, el primero con el propósito de observar tendencias tempranas del efecto del CBR y las BSC sobre el suelo salino sódico bajo condiciones controladas y el segundo para evidenciar en un contexto real el efecto del CBR y las BSC. Esta investigación se presenta en tres capítulos, el primero de ellos comprende el estudio realizado bajo condiciones de invernadero, el segundo el estudio realizado en campo, y el tercero las conclusiones generales y recomendaciones.

1. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE BACTERIAS GENERADORAS DE SUSTANCIAS HÚMICAS MEDIANTE BIOSOLUBILIZACIÓN DE CARBÓN DE BAJO RANGO EN UN SUELO SALINO-SÓDICO EN INVERNADERO

1.1 Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar en un suelo salino sódico el efecto de la aplicación de un carbón de bajo rango (CBR) tipo lignito, en conjunto con la inoculación de bacterias que liberan sustancias húmicas (SH) a partir de este tipo de carbón. Se determinó la actividad microbiológica del suelo y de enzimas relacionadas con la biotransformación del carbón mediada por microorganismos; así como algunas variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo. Mediante un ensayo en condiciones controladas bajo invernadero se trató el suelo aplicando CBR a razón de 1g/100g de suelo en bolsas plásticas con 3 kg de suelo, el tratamiento se completó con la aplicación de un inóculo de tres cepas bacterianas con capacidad para solubilizar carbón (*Bacillus mycoides*, *Microbacterium* sp y *Acinetobacter baumannii*). Como variables respuesta se midió la respiración del suelo, la actividad microbiológica mediante hidrólisis enzimática del diacetato de fluoresceína, la actividad de las enzimas lignino peroxidasa (LiP) y lacasas (Lac), el potencial de hidrogeno (pH), la conductividad eléctrica (C.E.), la razón de absorción de sodio (RAS), el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC); estas variables se midieron cada dos meses. Los resultados muestran que la aplicación del CBR al 1% y las bacterias solubilizadoras de carbón ocasionan incrementos en la respiración, actividad microbiológica, la actividad de las enzimas LiP y Lac, como también en la CIC. Así mismo, una disminución de la C.E., RAS y PSI a excepción del pH, lo cual sugiere la posibilidad de utilizar el CBR como una posible enmienda orgánica y las bacterias como aceleradoras de los procesos de biotransformación del CBR con el propósito de contribuir a la rehabilitación de suelos salinos-sódicos.

Palabras clave: solubilización de carbón, sustancias húmicas, suelos salinos-sódicos, enmienda orgánica.

1.2 Introducción

La salinización es un problema de orden mundial y se ha definido como la concentración de las sales solubles del suelo, que interfieren de manera negativa en el crecimiento de las plantas y degrada el suelo, debido al alto contenido de sales. Cuando el sodio es el catión dominante se genera dispersión de las arcillas, lo que lleva a una destrucción de la estructura. Por otra parte, cuando en un suelo la hidrólisis de las arcillas sódicas conduce a la alcalinización del perfil, y esta provoca intensa alteración mineral, se califican como suelos sódicos (en ocasiones alcalinos); y si existe un alto contenido en sales y estas son sódicas, es decir, el sodio predomina en el complejo de cambio se califican como suelos salino-sódicos (Otero *et al.*, 2002).

En el departamento del Cesar el 38, 44% de los suelos se caracterizan por ser salinos y salinos-sódicos lo que conlleva a la compactación, pérdida de la estructura e incidencia negativa en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que disminuye su productividad agrícola (Otero *et al.*, 2002). La aplicación de enmiendas orgánicas constituyen una alternativa para el acondicionamiento de suelos con estas características debido a que permite mejorar su estructura mediante la agregación, incrementa la actividad biológica y mejora la capacidad de intercambio catiónico (Tejada y Gonzalez, 2007; Sharif M., 2002; Hernández, 2000).

El carbón es una roca sedimentaria de origen orgánico que se genera por la diagénesis y el metamorfismo de la vegetación a cierta presión y temperatura; el índice de cambio sufrido por un carbón al madurar desde la turba hasta la antracita, conocido como carbonificación, tiene gran importancia en las propiedades físicas y químicas, y se denomina “rango” del carbón (Instituto Mundial de Carbón, 2005). El carbón es uno de los recursos más importantes en la economía del país y del departamento del Cesar, cuya extracción se realiza a gran escala. Esta actividad genera grandes cantidades de carbón comercial de alto poder calorífico; sin embargo, al realizarse el proceso de extracción, también se producen y acumulan cantidades significativas de carbón de bajo rango (CBR) tipo lignito. Se estima en Colombia una producción anual de 49.5 millones de toneladas de carbón, de las cuales se exportan 45.6, el restante no se exporta debido a su baja calidad (INGEOMINAS, 2010).

El CBR tipo lignito es un carbón que se caracteriza por ser normalmente blando y desmenuzable, con una aspecto mate y terroso, poseen altos niveles de humedad (30-45%) y cenizas, bajo contenido en carbono fijo por lo que su contenido energético también es bajo; debido al bajo grado de carbonificación estos materiales normalmente presentan alto contenido de SH (Peña, 2005; Gianoulli *et al.*, 2009). Gracias a su naturaleza orgánica y su contenido en elementos para la nutrición microbiana (Hölker *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2009) que mediante variados mecanismos pueden ser transformados generando productos útiles como las SH contenidas en su macroestructura (Peña, 2005); por esta razón estos carbones pueden aprovecharse como materia prima de enmiendas orgánicas para la agricultura y el manejo de suelos deteriorados (Senesi *et al.*, 1996; Chassapis y Roulia, 2008).

Existe gran cantidad de microorganismos con características fisiológicas que les permiten transformar CBR y otros compuestos orgánicos complejos debido a una serie de mecanismos conocidos como el sistema ABCDE (A= Sustancias alcalinas, oxidativas; B= Biocatalizadores; C= Queladores; D= Detergentes; E= Esterasas) (Fakoussa y Hofrichter, 1999). Las sustancias alcalinas como el amonio, aminos biogénicas y compuestos similares están involucrados en la licuefacción microbiana (solubilización) de carbón (Fakoussa y Hofrichter, 1999). Estos compuestos son producidos por hongos y bacterias que utilizan los compuestos del medio y son capaces de solubilizar grupos ácidos de la macroestructura del carbón por deprotonación, aumentando el potencial hidrofílico (Fakoussa y Hofrichter, 1999).

Los mecanismos más estudiados son los mediados por enzimas extracelulares producidas por muchos hongos Basidiomicetos, que poseen enzimas capaces de degradar la lignina debido a que ésta es el principal material parental en la formación del carbón. Se ha reportado que las enzimas ligninolíticas están disponibles para la biotransformación de CBR (Fakoussa y Hofrichter, 1999). Las enzimas ligninolíticas incluyen las peroxidasas (lignino peroxidasa LiP, manganeso peroxidasa MnP, y otras peroxidasas) y las enzimas fenol oxidasas Lac; el soporte de las enzimas (H_2O_2 =generador de oxidasas), ácidos orgánicos de bajo peso molecular (oxalato, lactato, malonato) y enzimas hidrolíticas como las esterazas que han sido encontradas en el hongo *Trametes versicolor* (Fakoussa y Hofrichter, 1999). Estos mecanismos actúan sobre el carbón permitiendo la producción de SH a través de la solubilización ó depolimerización, en el primero de los casos la solubilización del CBR conlleva a la formación de gotas líquidas de color oscuro (materia orgánica humificada) que ocurre a valores altos de pH (pH 7-10) y es debido a la acción de sustancias alcalinas, agentes quelantes, surfactantes y ciertas enzimas hidrolíticas. La depolimerización de CBR o de moléculas derivadas es el proceso mediado por enzimas ligninolíticas que ocurre a valores bajos de pH (pH 3-6) y resulta en la escisión de enlaces dentro de la molécula de carbón, permitiendo la formación de sustancias amarillentas llamadas ácidos fúlvicos con bajo peso molecular (Ralph y Catchside, 1994; Willmann y Fakoussa, 1997, Hofrichter y Fritsche, 1996, Fakoussa y Hofrichter, 1999).

No solo los hongos son capaces de biotransformar la lignina, también se han reportado algunas especies de bacterias con esta misma capacidad que han sido aisladas a partir de muestras de carbón como *Escherichia freundii*, *Pseudomonas rathonis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces setoni*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus* y *Rhodococcus* (Laborda *et al.*, 1997; Machnikowska *et al.*, 2002; Pokorný *et al.*, 2005) que son capaces de generar sustancias con características similares a las SH obtenidas a partir de CBR mediante extracción química (Filip y Kubát., 2001). En un trabajo previo en Colombia, a partir de muestras ambientales con presencia de residuos de carbón en la mina de carbón a cielo abierto “El Cerrejón” se aislaron y seleccionaron tres bacterias (*Bacillus mycoides*, *Acinetobacter baumannii* y *Microbacterium sp.*) con capacidad de solubilizar CBR tipo lignito y producir SH (Valero *et al.*, 2014).

Las SH son sustancias orgánicas naturales, ubicuas en el agua, el suelo y sedimentos, son importantes para estimular el crecimiento de las plantas, el control de los contaminantes del medio ambiente y la biogeoquímica de carbono orgánico (CO) en el ecosistema global

(Piccolo A., 2001). Las SH son utilizadas como abonos de origen natural que contribuyen al aumento de la capacidad de intercambio de iones del suelo, constituyen parte fundamental del complejo absorbente regulador de la nutrición de la planta hacia la conversión de formas no asimilables (Chen *et al.*, 1990) y desempeñan un papel primordial en la fijación de nutrientes en suelos disponibles para las plantas (Piccolo y Mbagwu, 1999) favoreciendo la transferencia de micronutrientes, aumentando la retención de agua y el porcentaje de germinación de las semillas. Las SH también contribuyen notablemente en la meteorización de rocas como agentes químicos (Tejada y Gonzalez, 2007), actuando como coadyuvantes en procesos de fitorremediación de suelos contaminados y estimulando el desarrollo de poblaciones microbianas en los suelos (Nutranetics, 2000, Siong *et al.*, 2007).

Con el propósito de aportar evidencias para el posible aprovechamiento del CBR y las bacterias solubilizadoras de carbón como una posible alternativa para acondicionar suelos con problemas de salinidad, teniendo en cuenta que este es un problema común en los suelos del Valle del Cesar, localizados en el área de influencia de la minería de carbón a cielo abierto, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de un CBR tipo lignito, en conjunto con la inoculación de bacterias que generan SH mediante la biosolubilización de carbón, sobre algunas propiedades biológicas, químicas y físicas en un suelo salino sódico, bajo condiciones de invernadero.

1.3 Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Invernadero del Laboratorio de Investigación en Fisiología y Bioquímica Vegetal del departamento de biología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, bajo condiciones controladas de temperatura (28 - 30°C), humedad relativa (75- 80%), y fotoperiodo (12/12 horas).

1.3.1 Muestras de carbón

Se utilizó un CBR tipo lignito colectado en el manto 40 del frente de extracción denominado Tajo Patilla en la mina El Cerrejón (La Guajira, Colombia). El CBR presentó una humedad del 28,44%, 11,12% de cenizas, 47,79% de sustancias volátiles, un poder calorífico de 4781 Kcal.kg⁻¹, 41,09% de carbono fijado y 0,13% de S; características que corresponden a un CBR tipo lignito por su alto contenido de humedad, materiales volátiles, y poder calorífico inferior a 6390 Kal/kg⁻¹. En el CBR los elementos C, H, O y N presentaron 46,04%, 3,26%, 42,95% y 1,38%, respectivamente. Los minerales en cenizas mostraron valores de Fe₂O₃ 4,24 %, CaO 69,3, MnO₂ 0,14%, MgO 9,37%, SrO 0,89%, K₂O 0,05%, BaO 0,08% (Valero 2013). El CBR antes de su uso en el experimento fue tamizado para obtener partículas con diámetro menor a 300 µm.

1.3.2 Bacterias solubilizadoras de carbón (BSC)

Para el estudio se emplearon cepas de las bacterias *Bacillus mycoides* (BSC25), *Acinetobacter baumannii* (BSC13) y *Microbacterium* sp (BSC3); la primera fue aislada de la rizósfera de *Typha domingensis* (gramínea que prolifera en áreas de acumulación de los sedimentos carbonosos), la segunda de sedimentos carbonosos procedentes del lavado del carbón y la tercera a partir de CBR (Valero *et al.*, 2012). Estas bacterias fueron seleccionadas por presentar la mayor capacidad de solubilizar CBR en medio sólido y líquido dando lugar a la liberación de SH (Valero *et al.*, 2011).

Las cepas se encontraban conservadas a 0°C en crioviales y se colocaron a crecer en cajas de Petri con Agar Nutritivo (Oxoid®), por 48h a 35°C \pm 2, posteriormente el inóculo se transfirió a frascos con 500ml de caldo nutritivo (Trypticase 20 g.L⁻¹, Tioglicolato de sodio 2 g.L⁻¹, Formaldehído sódico 1 g.L⁻¹, Cloruro sódico 5 g.L⁻¹ y Agar 15 gr.L⁻¹) y se colocaron en agitación a 250 rpm por 48h, hasta obtener la mayor cantidad de biomasa (Rojas, 2008). La concentración de cada inóculo bacteriano se determinó mediante la escala de Mc Farland (ICONTEC, 2000), hasta adecuar el inóculo a una concentración de 1×10^8 bacterias.mL⁻¹.

1.3.3 Muestras de suelo

Se utilizaron muestras tomadas a 20 cm de profundidad del horizonte A de un suelo salino-sódico Salidic Calciustolls, el cual presentó una textura franco areno arcillosa y en pasta de saturación un pH 10,07, porcentaje de saturación de agua 53,91%, CE 4,1dSm, RAS 32,64, PSI 93,3, Ca 2,7 mmol/L, Mg 1,2 mmol/L, K 0,24 mmol/L, Na 45,7 mmol/L, sulfatos 8,73 mmol/L, cloruros 14,5 mmol/L, bicarbonatos 21,4 mmol/L, CIC 12,0 cmol/kg y 11,12 cmol/kg de Na intercambiable.

1.3.4 Ensayo en Invernadero

Se realizó un experimento exploratorio en invernadero con el propósito de observar tendencias tempranas sobre el efecto del CBR y de las tres BSC (*Bacillus mycoides*, *Acinetobacter baumannii* y *Microbacterium* sp) sobre el suelo salino-sódico en condiciones controladas. Se monitoreó la respiración del suelo, la actividad microbiológica del suelo, las enzimas ligninolíticas y las variables asociadas a la salinidad del suelo.

El experimento se realizó en Bloques Completos al Azar (BCA), utilizando tres repeticiones por tratamiento. Se utilizaron 3 kg de suelo y se depositó en bolsas plásticas. Se realizó la aplicación de CBR a razón de 1g/100g suelo quedando a una concentración del 1%, los inóculos bacterianos de *B. mycoides*, *Microbacterium* sp y *A. baumannii* y el pool de bacterias se adicionaron a razón de 1×10^8 bacterias.mL⁻¹.g CBR⁻¹ (Tabla 1). En cada unidad experimental se sembró pasto estrella (*Cynodon plectostachium*), planta adaptada a las condiciones salino-sódicas (Más y García-Molinari, 2006), con el fin de contar con cobertura vegetal sobre el suelo y estimular la actividad biológica en la rizósfera. Se aplicó

riego para mantener la humedad del suelo aproximadamente a 50% de la capacidad de campo.

Tratamiento	Concentración de CBR (lignito)	Bacteria
1	1%	<i>Bacillus mycoides</i>
2	1%	<i>Microbacterium</i> sp
3	1%	<i>Acinetobacter baumannii</i>
4	1%	Pool*
5	1%	-
6	Control	-

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el experimento en condiciones de invernadero. *Pool: mezcla de *Microbacterium* sp., *B. mycoides*, *A. baumannii* a razón de 1×10^8 bacterias.mL⁻¹.g CBR⁻¹. Cada tratamiento n=3

Después de 2, 4 y 6 meses de haber iniciado el experimento se llevaron a cabo las mediciones de la respiración del suelo, actividad microbiológica del suelo, actividad de las enzimas LiP y Lac, pH, CE, RAS, PSI y CIC, cada parámetro por triplicado. La respiración del suelo se determinó por la técnica de incubación cerrada descrita por Celis *et al.*, (2009), con algunas modificaciones, para ello, se colocó en cada sistema de bolsa plástica, un vaso de plástico pequeño con 10mL de NaOH 0,5N sin tapa para adsorber el CO₂ liberado por el suelo, el cual se levantó a 1cm del suelo con un soporte; seguidamente se cubrió con un recipiente de plástico más grande invertido, el cual actuó como campana de respiración y se enterró hasta 2cm de profundidad para minimizar la difusión de CO₂ por el borde del frasco. Transcurridas 24 horas, se retiró el vaso con NaOH y se le adicionó 1mL de BaCl₂ para detener la reacción y así precipitar el C inorgánico como BaCO₃ insoluble. Posteriormente, se adicionaron unas gotas de fenolftaleína como indicador de ácido base y se tituló el NaOH con HCl 0,5N; se utilizaron patrones primarios para estandarizar previamente el HCl y el NaOH. La cantidad de CO₂ desprendido de las muestras se calculó mediante la fórmula de Krebs (2003).

La actividad microbiológica del suelo se determinó por el método propuesto por Schnürer y Rosswall (1982) de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína con modificaciones para muestras de suelo (Adam y Duncan, 2001; Greena *et al.*, 2006). El diacetato de fluoresceína es un compuesto químico utilizado para evaluar la actividad enzimática de las hidrolasas provenientes de los microorganismos. La presencia de estas enzimas se evidencia por la coloración (verde) que presenta el DAF luego de ser hidrolizado por las enzimas (Alvear *et al.*, 2007). Los resultados se interpolaron utilizando una curva patrón con concentraciones de fluoresceína conocidas (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 mg fluoresceína/mL) y se calculó el DAF hidrolizado (fluoresceína producida mg/kg suelo⁻¹.h⁻¹).

Se determinó la actividad de dos enzima ligninolíticas: una peroxidasa LiP y una fenol oxidasa Lac, debido a que éstas están asociadas a la solubilización de carbón por

mecanismos enzimáticos mediados por microorganismos. La primera enzima se determinó con el propósito de corroborar la solubilización de CBR ya sea por la flora microbiana nativa del suelo salino-sódico o el CBR como hábitat microbiano, y la segunda para evidenciar la solubilización del CBR por las BSC aplicadas, la flora microbiana nativa del suelo y los microorganismos propios del CBR aplicado. Se tomaron 2 g de suelo fresco de cada tratamiento y se adicionaron en 10mL de agua destilada estéril, seguidamente se llevaron a agitación a 250 rpm por 2 h y se centrifugaron a 8.000g por 20 minutos. Se realizó la separación del sobrenadante para la medida de la actividad de cada una de las enzimas. Para medir la actividad LiP se siguió el método propuesto por Fujian *et al.*, 2001 con modificaciones, para ello se mezclaron 400µl del sobrenadante en un tubo de 1ml y posteriormente se adicionaron 500µl de tartrato de sodio 0,3mM pH 3.0; seguidamente, se agregaron 50µl de alcohol veratrílico 10mM y se inició la reacción con 50µL de H₂O₂ 0,0016 M. Se realizaron mediciones de la absorbancia a una longitud de onda de 310nm. La cantidad de LiP requerida para oxidar 1mmol de alcohol veratrílico por minuto se definió como una unidad 1UI. La actividad de las Lac se evaluó siguiendo el método propuesto Borbonnais *et al.*, 1995, para ello se adicionaron 300µL de sobrenadante en 600µL de buffer acetato de sodio 60mM pH 4,5 y 50µL de ABTS 0,5 mM como sustrato y se midió la absorbancia a 420nm. Se definió 1UI como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1mmol de ABTS (C₁₈H₁₈N₄O₆S₄) por minuto.

El pH del suelo se determinó con potenciómetro, la conductividad eléctrica (CE) con conductímetro. El porcentaje de saturación de Sodio (PSI) y relación adsorción de sodio (RAS) se determinaron según los protocolos del laboratorio nacional de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC, 2006). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) por el método de acetato de amonio 1N y neutro. Todas las variables fueron determinadas en pasta de saturación.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, diferencias mínimas significativas y en algunos casos se aplicó la prueba de promedios de Dunnet, previo análisis de los parámetros de normalidad de los datos. Adicionalmente, los datos correspondientes al último muestreo fueron sometidos a un análisis de componentes principales para datos categóricos (CATPCA), utilizando el programa de análisis estadístico SPSS versión 18, con el fin de determinar la asociación entre todas las variables.

1.4 Resultados y discusión

1.4.1 Respiración de suelo

La respiración es considerada un indicador de la salud y calidad del suelo, puesto que representa la magnitud con que se desarrollan los procesos biológicos aerobios en el suelo (Mora, 2006). En la Figura 1 se observa que a los dos meses de haberse realizado la aplicación del CBR y las BSC todos los tratamientos excepto el C1%-*Microbacterium* sp. presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control. En el cuarto y sexto

mes se evidencia un incremento de la respiración del suelo en todos los tratamientos a diferencia del control ($P < 0,05$). Se observa, que la adición de las BSC y el pool de las 3 bacterias estimula la actividad respiratoria del suelo, lo que podría indicar la posible liberación de SH mediada por estas bacterias, las cuales contribuyen al acondicionamiento de suelos, como mejoradores de la estructura, y como coadyuvantes en procesos de fitorremediación de suelos contaminados (Piccolo y Mbagwu, 1999; Christanis *et al.*, 2006; Valero, 2013).

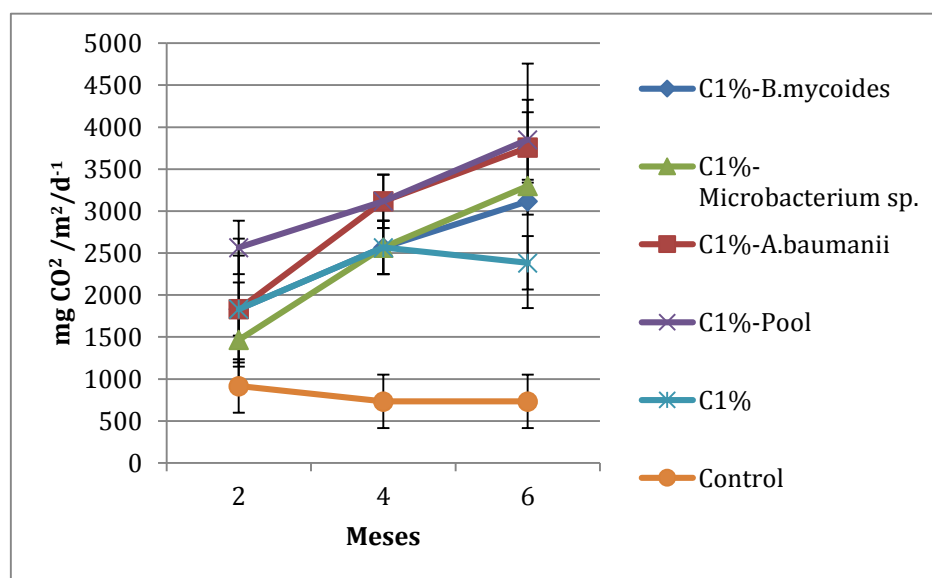


Figura 1. Respiración del suelo Salidic Calciustolls a los 2, 4 y 6 meses después de la aplicación de CBR y Bacterias productoras de SH (BSC). $n=3$

Adicionalmente, se observa incremento de la respiración del suelo con la adición del CBR al 1% en comparación con el control, lo que demuestra que la estimulación de la respiración es mayor independientemente de la adición de las BSC. Resultados similares fueron encontrados por Valero (2013) al tratar materiales edáficos (suelos removidos en la fase de pre-minería del carbón) con CBR que presentó un aumento en la respiración independientemente de aplicación conjunta del CBR con el pool de las 3 BSC. Esto puede explicarse, ya que el CBR que posee una alta superficie específica y porosidad (Levine *et al.*, 1982) favorece la aireación, la retención de humedad, propiciando un hábitat favorable para el crecimiento y la actividad de la microbiota acompañante del carbón y la presente en el suelo.

1.4.2 Actividad microbiológica

La actividad microbiana constituye un indicador de la dinámica y salud del suelo, una buena actividad microbiana refleja las óptimas condiciones físicas y químicas que permiten el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos y de su acción sobre los sustratos orgánicos (Delgado, 2004). Los microorganismos del suelo son un indicador sensible para detectar la degradación de los ecosistemas, su actividad en particular se

debilita, incluso, ante cambios o perturbaciones físicas y químicas leves del suelo (Alvear *et al.*, 2007). Los resultados presentados en la Tabla 2 muestran que durante todo el experimento los tratamientos C1%-*A.baumannii* y C1%-Pool presentaron la mayor actividad microbiológica con diferencias significativas ($P<0,05$) con respecto a los demás tratamientos; los tratamientos C1%-*B.mycoides*, C1%-*Microbacterium* sp. presentaron diferencias significativas ($P<0,05$) con respecto al control durante los primeros dos meses. Se evidencia que las BSC estimulan la actividad microbiológica y esto puede explicarse en razón a que la biotransformación del CBR por estas bacterias da lugar a la liberación de SH, las cuales contribuyen a la formación de agregados en el suelo (Piccolo, 2002), el crecimiento y actividad microbiana, la aireación del suelo y la retención de humedad. Por lo anterior, los resultados muestran que existe un mayor efecto de la actividad microbiológica cuando el CBR se aplica en el suelo salino-sódico en conjunto con el inóculo bacteriano de *A.baumannii* y el Pool, este resultado es diferente a lo encontrado por Valero (2013) quien evidenció que el efecto del CBR sobre la actividad microbiológica en materiales edáficos de suelos removidos era independiente de la adición de las BSC.

Tratamientos	Actividad Microbiológica (fluoresceína producida mg. kg suelo ⁻¹ .h ⁻¹)		
	2 meses	4 meses	6 meses
C1%- <i>B.mycoides</i>	117,17± 0,58	107,01±1,59	97,29±0,92
C1%- <i>Microbacterium</i> sp.	109,34± 1,20	98,73±1,26	94,62±2,17
C1%- <i>A.baumannii</i>	125,73±2,08	109,62±1,49	106,62±0,25
C1%-Pool	129,29±1,73	110,79±5,60	108,45±2,83
C1%	90,12±3,09	91,91±7,17	86,29±3,37
Control	80,56±7,73	79,95±6,17	80,62±6,12

Tabla 2. Actividad microbiológica (mg. kg suelo⁻¹.h⁻¹) del suelo Salidic Calciustolls a los 2, 4 y 6 meses de haber sido tratado con la adición de CBR y bacterias productoras de SH. n=3

1.4.3 Actividad de las enzimas LiP y Lac

Los resultados presentados en la Figura 2a indican que la actividad de las enzimas LiP en el segundo y cuarto mes para los tratamientos C1%-Pool, C1%-*A.baumannii* y C1% presentan diferencias significativas ($P<0,05$) con respecto al control; mientras que para el sexto mes se presentan diferencias significativas entre los tratamientos C1%-Pool y C1%-*A.baumannii* también con respecto al control.

De acuerdo a estos resultados, no es posible atribuir la actividad de las enzimas LiP al inóculo aplicado, debido a que las cepas de *B.mycoides*, *Microbacterium* sp. y *A. baumannii* empleadas en este bioensayo no han sido reportadas como productoras de enzimas LiP, las cuales están más asociadas a los hongos (Fakoussa y Hofrichter, 1999). Sin embargo, las bacterias utilizan mecanismos no enzimáticos para la solubilización del CBR como la producción de agentes surfactantes, liberación de compuestos quelantes de los metales que

unen la estructura macromolecular del carbón, y la producción de sustancias alcalinas que disuelven las moléculas solubles y SH de la matriz del carbón (Hofrichter y Fakoussa., 2004). Por tanto, la actividad de las enzimas LiP puede ser atribuida a los hongos que se encuentran como flora acompañante en los espacios porosos del CBR empleado, y que gracias a su naturaleza orgánica y a su contenido de elementos importantes para la nutrición microbiana como nitrógeno, azufre, hierro, carbono, oxígeno e hidrógeno y elementos trazas, hacen que este sea un sustrato para la colonización y crecimiento de microorganismos, cuyos procesos biológicos puedan utilizarlo como fuente de energía (Hölker *et al*, 2002; Tao *et al*, 2009).

En cuanto a la actividad de las enzimas Lac (Figura 2b) se evidenciaron diferencias significativas durante los 6 meses de haber sido tratado el suelo con CBR y las BSC en todos los tratamientos con respecto al control. Se han reportado algunas bacterias con capacidad de producir enzimas lacasas (Madhai y Lele, 2009; Diamantidis *et al.*, 2000), y como las BSC utilizadas en el experimento transforman CBR y la su actividad Lac fue mayor cuando se inoculan en pool e individualmente, entonces hay evidencia de que las BSC presenten actividad Lac. Se destaca el tratamiento C1%-*Acinetobacter baumannii* que presentó la mayor actividad Lac. También es posible que la actividad Lac esté asociada a bacterias y hongos que se encuentren en el CBR utilizado en el experimento o en la microbiota nativa del suelo.

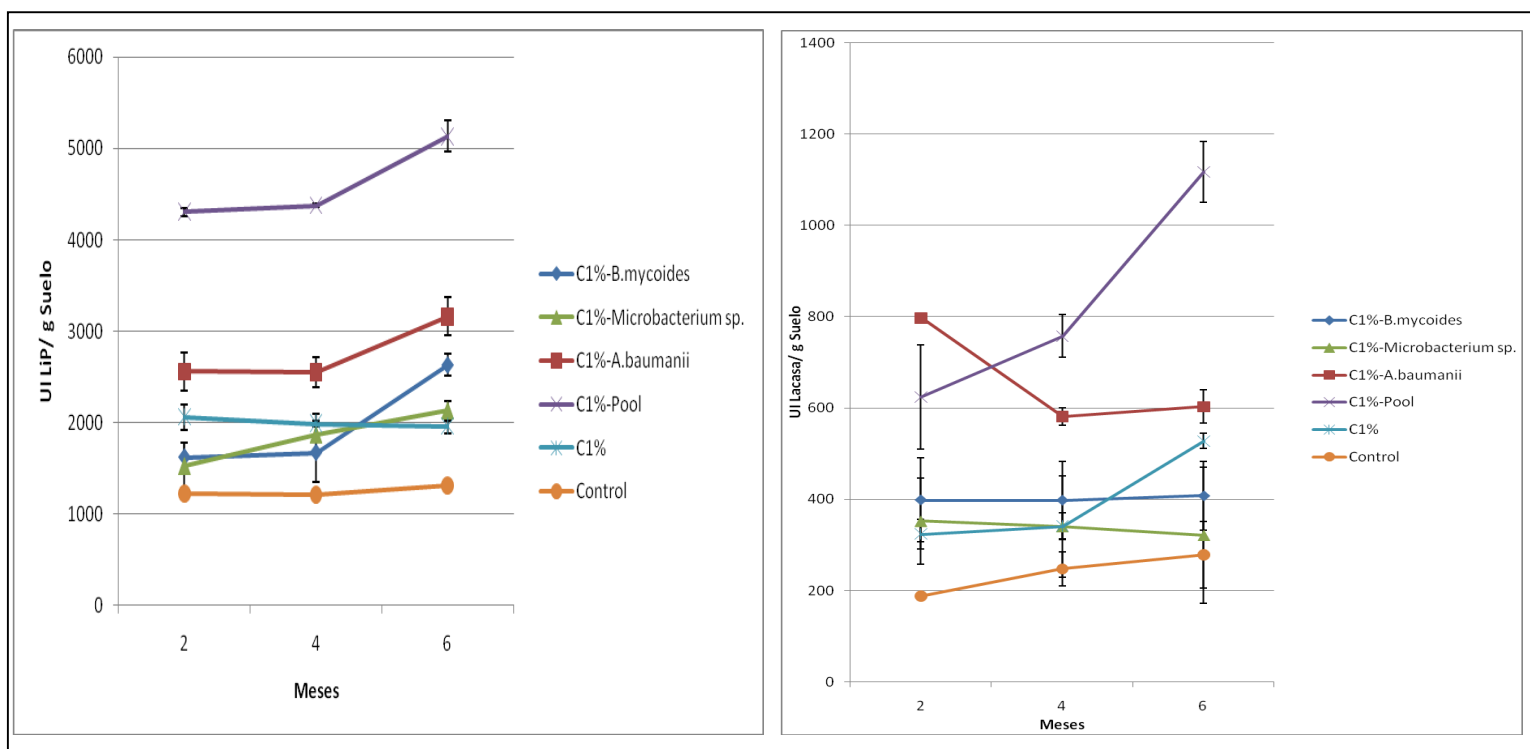


Figura 2. Actividad de las enzimas ligninolíticas LiP y Lac (UI/g Suelo) en el tratamiento de un suelo Salidic Calciustolls con CBR y BSC. n=3

1.4.4 Variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo.

De acuerdo a la prueba de comparación de promedios de Dunnet, en el pH del suelo no se encontraron diferencias significativas durante los 6 meses de experimento en invernadero. En cuanto a la CE en el segundo mes se evidenciaron diferencias significativas en los tratamientos C1%-Pool, C1%, C1%-*A.baumannii*, C1%-*Microbacterium* sp y C1%-*B.mycoides* con respecto al control, mientras que el cuarto mes se observa que solo los tratamientos C1%-Pool, C1%, C1%-*A.baumannii* mantienen diferencias significativas con respecto al control, y en el sexto mes se presentan diferencias significativas del tratamiento C1% con respecto al control lo que permite establecer el efecto positivo que tiene tanto el carbón como la aplicación conjunta del CBR más las BSC sobre la CE.

Tratamientos	pH			CE (dS.m)			RAS (mmol/dm ³)			PSI (%)		
	Meses											
	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
C1%- <i>B.mycoides</i>	10,0±0,57	9,9±0,57	9,8±0,0	5,30±0,75	5,2±0,76	5,5±1,00	21,6±4,95	21,6±4,95	32,2±1,05	37,4±0,56	37,4±0,56	59,9±0,37
C1%- <i>Microbacterium</i> sp.	9,8±0,25	9,8±0,20	9,8±0,23	5,06±0,63	5,1±0,58	5,5±0,40	34,2±5,48	34,2±5,48	35,1±8,13	37,3±6,25	37,3±6,25	55,8±2,30
C1%- <i>A.baumannii</i>	9,5±0,46	9,8±0,35	9,7±0,05	4,30±0,0	4,8±0,25	5,1±0,30	23,0±0,00	23,0±0,00	46,5±0,00	33,6±7,96	33,6±7,96	50,5±14,95
C1%-Pool	9,8±0,10	9,8±0,10	9,8±0,10	3,76±0,73	4,4±0,92	5,2±0,88	22,4±0,10	26,3±6,69	44,4±0,00	55,6±5,75	55,6±5,75	58,7±1,59
C1%	9,6±0,0	9,7±0,11	9,8±0,20	4,23±0,11	4,5±0,35	4,8±0,34	24,4±0,40	24,4±1,09	31,5±6,69	46,0±3,11	46,0±3,11	59,5±0,20
Control	10,0±0,0	10,3±0,0	10,4±0,32	7,93±0,58	7,90±0,58	7,9±0,58	56,8±0,11	56,8±0,11	56,8±0,11	61,2±8,70	61,2±8,70	61,2±8,70

Tabla 3. Determinación de las variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo posterior a la aplicación de CBR y bacterias productoras de SH. n=3. Conductividad eléctrica (CE), Relación adsorción de sodio (RAS), Porcentaje de saturación de Sodio (PSI).

En cuanto al RAS y el PSI se presentó una disminución en el suelo salino-sódico tras ser tratado con CBR y las BSC, presentándose un mayor efecto en el RAS cuando se adiciona el CBR solo o en conjunto con las BSC durante los seis meses del experimento con diferencias significativas ($P<0,05$) con respecto al control; mientras que en el PSI se presenta una mayor disminución cuando el suelo es tratado con CBR y *Acinetobacter baumannii*. Estos resultados permiten demostrar que la adición CBR con o sin las BSC disminuyen el RAS y el PSI, lo que difiere con lo reportado por Gasca *et al.* (2011) al utilizar vinaza como enmienda orgánica en un suelo Petrocalcic Natrustalf, en donde no evidenció cambios significativos en el RAS y el PSI; sin embargo, observó cambios en el sodio intercambiable.

1.4.5 Capacidad de intercambio catiónico

En la Tabla 4 se muestra que la CIC es mayor en todos los tratamientos, con diferencias significativas con respecto al control durante todos los meses evaluados, lo que permite deducir que el CBR como fuente de materia orgánica humificada aumenta la CIC. Es evidente que se presenta un mayor efecto cuando se aplica el CBR en conjunto con el inóculo de las BSC y con el pool de las tres cepas, lo cual indica que se pueden liberar las SH contenidas en el CBR a través de la biosolubilización del CBR, éstas SH una vez liberadas actúan como polielectrolitos

incrementando la CIC. También el CBR en sí mismo es un material con alta CIC debido a la presencia de grupos fenólicos y carboxílicos entre otros sitios de intercambio (Janos *et al.*, 2011).

Tratamientos	CIC (cmol(+)/Kg)		
	Meses		
	2	4	6
C1%- <i>B.mycoides</i>	9,1±0,65	9,2±0,36	9,1±0,10
C1%- <i>Microbacterium</i> sp.	9,43±0,40	9,3±0,15	9,1±0,10
C1%- <i>A.baumannii</i>	9,0±0,11	9,0±0,05	9,0±0,10
C1%-Pool	9,4±0,10	9,3±0,10	9,1±0,11
C1%	9,5±0,05	9,2±0,26	9,1±0,32
Control	7,4±1,08	7,4±0,05	7,4±0,25

Tabla 4. Determinación de la CIC en el suelo Salidic Calciustolls tras ser tratado con CBR y las BSC bajo condiciones de invernadero. n=3

En la figura 3 se presenta el análisis de componentes principales para datos categóricos (CATPCA), realizado para establecer patrones de relaciones entre las variables evaluadas en el experimento. El CATPCA logró explicar en dos componentes el 57.5% de la variabilidad en los datos originales (Figura 3b).

La dimensión 1 explica el 37,5% de la varianza y las variables con mayor influencia en esta dimensión fueron el tratamiento del suelo con el pool de BSC, la actividad microbiológica del suelo, la respiración del suelo, la actividad de las enzimas LiP y lacasas y la CIC; el pH y la CE presentaron una relación inversa con el anterior grupo de variables (Figura 3c). La dimensión 2 explica el 19,8% de la varianza y las variables con mayor influencia en esta dimensión fueron el tratamiento del suelo con el pool de BSC, la CE y el RAS; La CIC y el CBR (aplicado solo) presentaron una relación inversa con las anteriores variables.

El análisis mostró una asociación fuerte entre los siguientes grupos de variables: 1) El tratamiento del suelo con el pool de las 3 BSC, la actividad microbiológica y la actividad de las enzimas LiP y lacasas; 2) la respiración del suelo con el conjunto de variables anteriores. Este análisis confirma que al tratar el suelo con el inóculo de BSC y el CBR se genera un efecto positivo en la magnitud de la respiración del suelo, la actividad de las enzimas ligninolíticas y la actividad microbiológica debido a que favorece el desarrollo de los microorganismos presentes en el suelo, la flora microbiana acompañante del CBR y las BSC aplicadas, por lo que su acción sobre los sustratos orgánicos pueden dar lugar a la liberación de SH (Delgado, 2004). 3) La correlación entre la respiración del suelo y la CIC, debido a la posible liberación de SH y a la alta CIC del CBR, la actividad de los microorganismos presentes en el suelo o las BSC aplicadas se ven favorecidos por la adición de CBR. 4) El resultado del tratamiento del suelo con CBR, CBR+ *Microbacterium* sp y CBR+ *B. mycoides*, sugiere que el efecto del CBR es similar si se aplica o no con las BSC; esto posiblemente ocurre por la liberación de SH desde el CBR, ya sea por la actividad de las BSC inoculadas o por la microbiota nativa del suelo en respuesta al ingreso de CBR como fuente de C y como hábitat microbiano. 5) El pH, CE y RAS permite explicar que estas variables corroboran las características de los suelos salinos y salino-sódicos que presentan pH alcalinos, CE >4.0 dS.m⁻¹ y RAS >12,1 mmol/dm³.

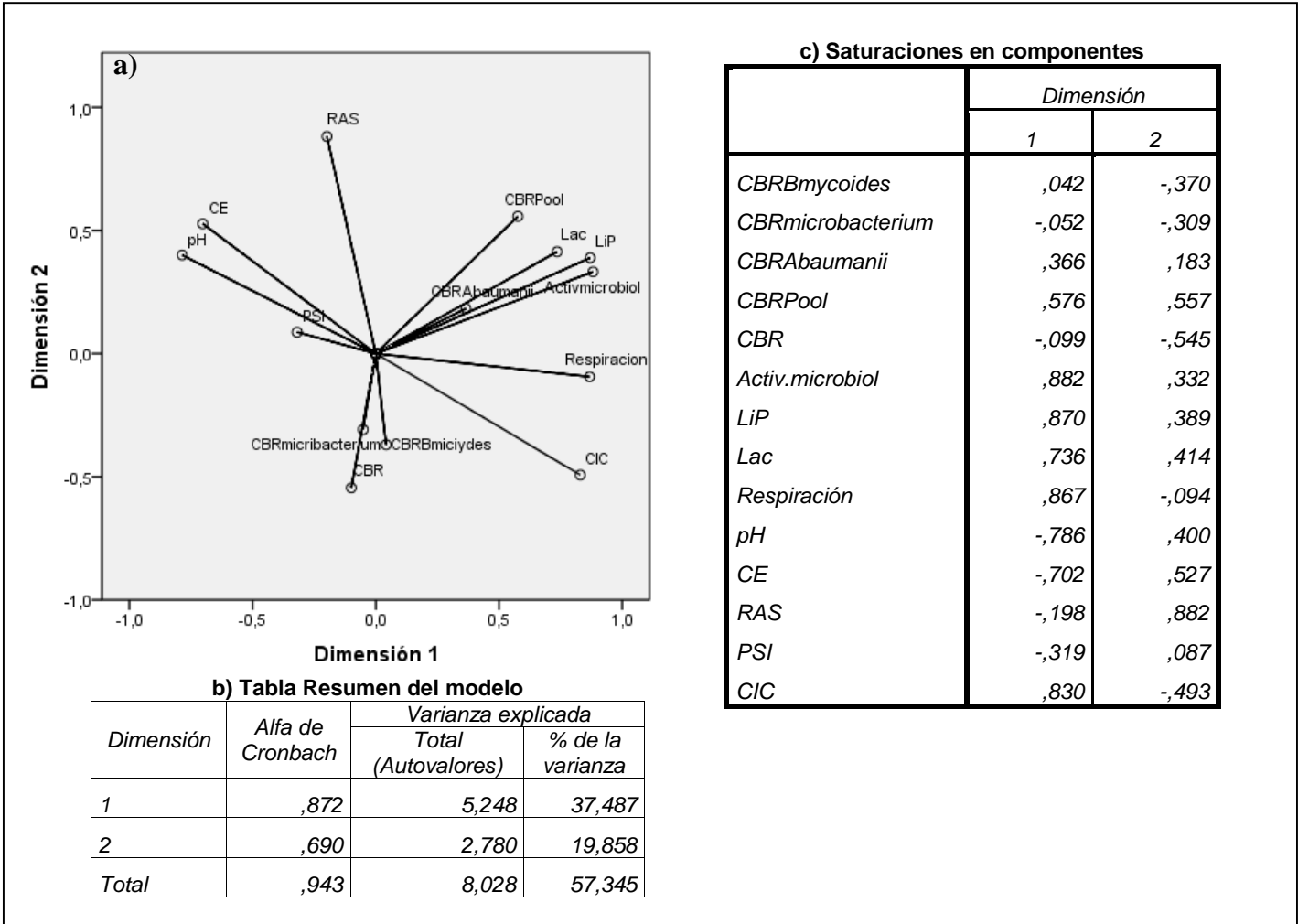


Figura 3. Análisis (CATPCA). Asociación de las variables evaluadas en el suelo Salidic Calciustolls tratado con la adición de CBR y BSC en invernadero.

También se puede observar que estas variables presentan una relación inversa con el efecto del tratamiento del suelo con el pool de las 3 BSC, la actividad microbiológica, la actividad de las enzimas LiP y lacasas, la respiración y la CIC; esto indica que el tratamiento del suelo con el pool es el que ejerce mejor efecto al causar un atenuación de las variables relacionadas con la salinidad y que además se ve reflejado en mayor actividad microbiana lo cual se comprueba por el resultado de la hidrólisis del DAF y la respiración, también sugiere que actúan las enzimas ligninolíticas que posiblemente son generadas por los microorganismos nativos del suelo o la flora acompañante del CBR y posiblemente sea mediante la liberación de SH por depolimerización de la matriz húmica del CBR.

1.5 Conclusiones

La aplicación de CBR al 1% y las BSC en el suelo Salidic Calciustolls favorece la actividad biológica a corto plazo, la cual se vio reflejada en el incremento de la respiración del suelo, la actividad de enzimas hidrolíticas sobre el DAF, la actividad de las enzimas ligninolíticas LiP y Lac asociadas a la biotransformación de CBR, y al incremento la CIC. Igualmente dicho tratamiento ocasiona un cambio favorable a corto plazo sobre las variables químicas relacionadas con la salinidad sódica del suelo, lo cual se observa en la disminución de la C.E., RAS y PSI.

El efecto de la adición de CBR sobre las propiedades biológicas y químicas en el suelo salino sódico es mayor cuando se aplica en conjunto con las tres BSC. El CBR en sí mismo puede ocasionar cambios favorables en las propiedades del suelo salino-sódico.

2. EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE CARBÓN DE BAJO RANGO Y BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE CARBÓN EN UN SUELO SALIDIC CALCIUSTOLLS EN EL VALLE DEL CESAR

2.1 Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la aplicación de un carbón de bajo rango (CBR), en conjunto con la inoculación de bacterias con capacidad para solubilizar carbón (*Bacillus mycoides*, *Microbacterium* sp y *Acinetobacter baumannii*) sobre algunas propiedades químicas, biológicas y físicas en un suelo Salidic Calciustolls bajo condiciones de campo. Se delimitaron parcelas de 5m² las cuales fueron tratadas con adición de 5 kg de CBR/m² y el inóculo de las tres bacterias. Se midió la respiración del suelo por la técnica de incubación cerrada, la actividad microbiológica mediante la hidrólisis del diacetato de fluoresceína, la actividad de las enzimas lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas (Lac). También se midió el potencial de hidrogeniones (pH), la conductividad eléctrica (C.E.), la razón de absorción de sodio (RAS), el porcentaje de sodio intercambiables (PSI) y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) cada dos meses y la densidad aparente (Da) al sexto mes de haber iniciado el experimento. La aplicación de CBR contribuyó a la disminución de la C.E., RAS y PSI, con excepción del pH. No se evidenciaron cambios significativos en la densidad aparente, sin embargo se logró incrementar la respiración, la actividad microbiológica, la estimulación de la actividad de las enzimas LiP, MnP y Lac, como también a aumentar la CIC del suelo. Estos resultados sugieren la posibilidad de aprovechar el CBR como materia orgánica humificada que permita rehabilitar suelos con problemas de degradación por salinidad, lo cual es común en los suelos del departamento del Cesar.

Palabras clave: Lignito, sustancias húmicas, biotransformación del carbón, salinidad de suelos

2.2 Introducción

En la actualidad la salinización es un factor de preocupación mundial, se estima que sobre 800 millones de hectáreas en el planeta están afectadas por sales, de estas 397 millones lo son por problemas de salinidad y 434 millones por condiciones asociadas a sodicidad (Munns, 2005; FAO, 2000). La concentración de sales impide el crecimiento de las plantas y la producción de los cultivos al limitar su capacidad para absorber el agua, contribuye a los procesos de degradación de los suelos por aumento de la dispersión, compactación y erosión del suelo.

La principal fuente de sal en los suelos proviene de la meteorización y erosión de rocas y minerales primarios formados *in situ* o transportados por el agua o el viento. Entre las principales causas que generan procesos de salinización son el riego con agua salina, el nivel de las aguas subterráneas, la evapotranspiración, la percolación del agua a través de materiales salinos y la intrusión de agua de mar (Metternich, 2003). Sin embargo, la dinámica de las sales es tan alta que no siempre pueden asociarse directamente con los materiales del que preceden los suelos sino que debe tenerse en cuenta factores climáticos, topográficos, hidrológicos y antrópicos (Gómez, 2004).

La adición de materia orgánica al suelo (MOS) ha sido frecuentemente utilizada para ayudar en la rehabilitación de tierras degradadas (Ros et al., 2003), ya que diversos estudios han demostrado el efecto positivo de la MOS en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Khaled y Fawy, 2011), lo que ha permitido ser reconocida como clave fundamental en la fertilización de los suelos, la productividad de los cultivos, la degradación, erosión y desertificación de los suelos. La MOS puede mejorar la estructura del suelo y la agregación, la conductividad hidráulica, promueve los altos niveles de nutrientes y una mayor capacidad de intercambio catiónico (Tejada y Gonzalez, 2007; Sharif M., 2002; Hernández, 2000).

En suelos sódicos y salino-sódicos el yeso ($\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) es el mejorador mas comúnmente utilizado para mantener los niveles de electrolitos del suelo para mejorar sus propiedades físicas y hidráulicas (Wong *et al.*, 2009). También se ha utilizado la aplicación conjunta de yeso-azufre-compost, que en la mayoría de los casos se ha venido disminuyendo su uso por los agricultores por los elevados costos del azufre y nuevas tecnologías como el uso de biofertilizantes (microorganismos benéficos y micorrizas), biopolímeros y electromagnetismo que estimulan la actividad microbiana, mejoran considerablemente las propiedades físicas del suelos afectados por salinización permitiendo disminuir la compactación y mejorar la estructura del suelo a largo plazo (Zuñiga *et al.*, 2011). Por otra parte, se han realizado estudios de la incorporación de la vinaza como enmienda procedente de la industria del alcohol carburante sobre suelos afectados por sodicidad, influyendo favorablemente sobre algunas propiedades químicas y biológicas del suelo, contribuyendo al incremento del carbono inmovilizado por los microorganismos y la actividad microbiológica (Gasca *et al.*, 2011). Por tanto, la aplicación de enmiendas orgánicas constituyen una alternativa para el acondicionamiento de suelos con estas características, debido a que permite mejorar la estructura mediante la agregación, incrementa la actividad biológica y mejora la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

El carbón de bajo rango como el lignito se origina mediante un proceso de carbonificación incompleto, en donde la lignina procedente de los restos vegetales se transforma parcialmente; se caracteriza por ser normalmente blando y desmenuzable, con una aspecto mate y terroso, posee altos niveles de humedad (30-45%) y cenizas, bajo contenido en carbono fijo por lo que su contenido energético también es bajo (Instituto Mundial de Carbón, 2005). Debido al bajo grado de carbonificación el CBR presenta un alto contenido de SH (Peña, 2005, Gianoulli *et al.*, 2009) en su macroestructura, que mejora la estructura y las propiedades físicas del suelo, mediante el aumento de la capacidad de intercambio de iones, promueve la quelación de muchos elementos al ponerlos a disposición de las plantas, constituyéndose como parte fundamental del complejo absorbente regulador de la nutrición de la planta (Chen *et al.*, 1990, Khaled y Fawy, 2011), lo que permite utilizar las SH como enmiendas orgánicas para la agricultura y el manejo de suelos deteriorados (Senesi, 1996, Chassapis y Roulia, 2008).

Existen evidencias que el CBR es susceptible a la biotransformación por microorganismos debido a que puede ser utilizado por estos como fuente de carbono y favorecer el crecimiento (Hölker *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2009) de los hongos involucrados en la degradación de la lignina (Hofrichter *et al.*, 1999; Fakoussa y Hofrichter, 1999; Yuan *et al.*, 2006) y algunas bacterias (Laborda *et al.*, 1997; Machnikowska *et al.*, 2002; Pokorny *et al.*, 2005; Valero, 2014), generan sustancias similares a las SH extraídas químicamente a partir de CBR (Filip y Kubat, 2001). El principal mecanismo de solubilización de carbón es la producción de enzimas ligninolíticas por hongos que incluyen las peroxidasa lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), y las enzimas fenol oxidasas conocidas como lacasas (Lac) (Fakoussa y Hofrichter, 1999; Gokcay *et al.*, 2001; Grihunt *et al.*, 2011), pero también se ha encontrado que posterior a la solubilización ocurre la depolimerización de las SH a través de estos mismos mecanismos enzimáticos (Hofrichter y Fritsche, 1997). Debido a los inconvenientes de la solubilización mediada por hongos, se encuentra la solubilización del carbón por bacterias que utilizan mecanismos no enzimáticos como la producción de agentes quelantes, agentes surfactantes y sustancias alcalinas (Hofrichter y Fakoussa, 2004), que puede ser una alternativa que evite la depolimerización de las SH producidas a partir de CBR.

Dentro de este contexto, en la mina de carbón a cielo abierto El Cerrejón (La Guajira, Colombia) se aislaron microorganismos con capacidad de biotransformar CBR y liberar SH (Valero *et al.*, 2012) y se identificaron cepas de las bacterias *Bacillus mycoides*, *Acinetobacter baumannii* y *Microbacterium* sp. con capacidad de solubilizar CBR en medio sólido y líquido que generaron sustancias húmicas hasta de 3100mg.L⁻¹ (Valero *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta que el CBR es considerado un residuo de la minería de carbón que podría ser aprovechado como materia orgánica humificada, el presente trabajo de investigación se orientó a evaluar el efecto de la aplicación de CBR y estas tres bacterias nativas sobre algunas propiedades físicas, químicas y biológicas, en un suelo salino-sódico en condiciones de campo, como una posible alternativa de aprovechar el CBR y los recursos biológicos de la región para acondicionar suelos con problemas de salinidad, teniendo en cuenta que este es un problema común en los suelos del departamento del Cesar, localizados en el área de influencia de la minería de carbón a cielo abierto.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Muestras de carbón

Se utilizó un CBR tipo lignito colectado en el manto 40 del frente de extracción denominado Tajo Patilla en la mina El Cerrejón (La Guajira, Colombia). El CBR presentó una humedad del 28,44%, 11,12% de cenizas, 47,79% de sustancias volátiles. Del mismo modo, presentó un poder calorífico de 4781 Kcal. kg⁻¹, 41,09% de carbono fijado y 0,13% de S; características que corresponden a un CBR tipo lignito por su alto contenido de humedad y de materiales volátiles, y poder calorífico inferior a 6390 Kal/kg⁻¹ (Valero *et al.*, 2014). En el CBR los elementos C, H, O y N presentaron 46,04%, 3,26%, 42,95% y 1,38%, respectivamente. Los minerales en cenizas mostraron valores de Fe₂O₃ 4,24 %, CaO 69,3, MnO₂ 0,14%, MgO 9,37%, SrO 0,89%, K₂O 0,05%, BaO 0,08%. Adicionalmente, el CBR presentó contenidos de As, Co, Pb, V, Cu, Zn, Ni, Cr, B, Mo y Cd (0,71, 2,31, 1,73, 1,66, 0,55, 22,43, 3,35, 2,4, 15,11, 2,52 y 0,08 ppm, respectivamente), descartándose la

posibilidad de toxicidad de metales pesados al aplicar el CBR al suelo (Valero *et al.*, 2014) y fue tamizado para obtener partículas de 300µm para ser utilizado en el experimento.

2.3.2 Bacterias solubilizadoras de carbón (BSC)

Para el estudio se emplearon cepas de las bacterias caracterizadas por biología molecular: *Bacillus mycoides* (BSC25), *Acinetobacter baumannii* (BSC13) y *Microbacterium* sp (BSC3); la primera fue aislada de la rizósfera de *Typha domingensis* (gramínea que prolifera en áreas de acumulación de los sedimentos carbonosos), la segunda de sedimentos carbonosos procedentes del lavado del carbón, y la tercera a partir de CBR (Valero *et al.*, 2012). Estas bacterias fueron seleccionadas por presentar la mayor capacidad de solubilizar CBR en medio sólido y líquido dando lugar a liberación de SH (Valero *et al.*, 2011).

Las cepas se encontraban conservadas en crioviales a 0°C, luego se reactivó su crecimiento colocándolas en cajas de Petri con Agar Nutritivo (Oxoid®), por 48h a 35°C ± 2, posteriormente el inóculo se transfirió a frascos con 500ml de caldo nutritivo (Trypticase 20 g.L⁻¹, Tioglicolato de sodio 2 g.L⁻¹, Formaldehído sódico 1 g.L⁻¹, Cloruro sódico 5 g.L⁻¹ y Agar 15 g.L⁻¹) y se colocaron en agitación a 250 rpm por 48h, hasta obtener la mayor cantidad de biomasa (Rojas, 2008). La concentración de cada inóculo bacteriano se determinó mediante la escala de Mc Farland (ICONTEC, 2000) hasta alcanzar una concentración de 1 x 10⁸ bacterias.mL⁻¹.

2.3.3 Clasificación taxonómica del suelo

La clasificación taxonómica del suelo se inició a través de estudios previos de muestras de suelos que fueron analizadas en laboratorio y los resultados mostraron que en el Lote 9 presentaba problemas de salinidad sódica. Por tanto, se procedió a buscar en los mapas del último estudio de suelos del Cesar (IGAC, 1984) las unidades cartográficas, consociaciones y las clasificaciones taxonómicas de los suelos del área de estudio. Posteriormente, se realizó una calicata para describir el suelo y se tomaron muestras de cada horizonte diagnóstico que fueron llevadas al laboratorio y se le determinaron propiedades químicas y mineralógicas, siguiendo los protocolos del laboratorio nacional de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC, 2006).

2.3.4 Ensayo en campo

La investigación se desarrolló en el lote 9 de la granja del Centro Biotecnológico del Caribe ubicado en el municipio de Valledupar, km 7 vía La Paz y geográficamente a latitud norte 10°23'55 66''N longitud oeste 73°13'47 06''O. La zona de vida corresponde a bosque seco tropical (bs – T) según la clasificación de L.R. Holdridge, con una temperatura promedio de 28,4°C y una altura de 169 msnm, precipitación anual de 961 mm y humedad relativa de 67%. En la zona, las velocidades del viento alcanzan los 14,76 km/h, las precipitaciones son moderadas, repartidas entre los meses de abril y noviembre con máximas en mayo y octubre, esto la provee de un clima ligeramente cálido (IDEAM, 2005).

En el área delimitada para desarrollar el experimento se preparó el suelo mediante el paso de un cincel rígido que permitiera romper la compactación del suelo y posteriormente se le aplicó riego. En todos los tratamientos se aplicó CBR a razón 5 kg/m² y los inóculos bacterianos *Bacillus mycoides*, *Acinetobacter baumannii*, *Microbacterium* sp. y el pool de las tres BSC a una concentración de 1x10⁸ bacterias.mL⁻¹ a razón de 100mL/m². Tanto el CBR como las BSC fueron mezcladas con el suelo a una profundidad de 20cm y se siguieron los tratamientos presentados en la Tabla 5.

Tratamiento	Suelo salino sódico	Concentración de CBR	Bacteria	Pasto estrella
1	X	1%	<i>Bacillus mycoides</i>	X
2	X	1%	<i>Microbacterium</i> sp	X
3	X	1%	<i>Acinetobacter baumannii</i>	X
4	X	1%	Pool*	X
5	X	1%	-	X
6	X	control	-	X

Tabla 5. Tratamientos del montaje experimental en campo. *Pool: *Microbacterium* sp., *B. mycoides*, *A. baumannii*. n=3

Se siguió un diseño de bloques completos al azar, cada tratamiento tuvo tres repeticiones y la unidad experimental consistió en una parcela de 5m², separadas de 2m de la parcela contigua con una barrera de 50cm de altura, para reducir contaminación cruzada entre tratamientos por flujo superficial o el viento. En todas las parcelas se utilizó pasto estrella (*Cynodon plectostachium*) que se encontraba previamente establecido en el suelo y se caracteriza por su adaptación a las condiciones salino-sódicas (Más y García-Molinari, 2006), lo que permitió aprovecharlo como cobertura vegetal sobre el suelo y a la vez como estimuladora de la actividad biológica en la rizósfera.

Transcurridos 2, 4 y 6 meses de haberse iniciado el experimento se determinaron las variables de respuesta. La respiración del suelo se determinó por la técnica de incubación cerrada descrita por Celis *et al.* (2009), con algunas modificaciones; para ello, se colocaron sobre el suelo, vasos pequeños con 10mL de NaOH 0,5N sin tapa para adsorber el CO₂ liberado por el suelo, el cual estaba levantado a 1cm del suelo con un soporte, seguidamente se cubrió con un frasco plástico más grande invertido, el cual actuó como campana de respiración y se enterró hasta 2cm de profundidad para minimizar la difusión de CO₂ por el borde del frasco. Transcurridas 24 horas, se retiró el vaso con NaOH y se le adicionó 1mL de BaCl₂ para detener la reacción y así precipitar el C inorgánico como BaCO₃ insoluble. Posteriormente, se adicionaron unas gotas de fenolftaleína como indicador de ácido base y se tituló el NaOH con HCl 0,5N; se utilizaron patrones primarios para valorar la concentración del HCl y del NaOH. La cantidad de CO₂ desprendido de las muestras se calculó mediante la fórmula de Krebs (2003).

La actividad microbiológica del suelo se determinó por el método propuesto por Schnürer y Rosswall (1982) de la hidrólisis de diacetato de fluoresceína (DAF) con modificaciones para

muestras de suelo (Adam & Duncan, 2001, Greena *et al.*, 2006). La presencia de estas enzimas se evidencia por la coloración (verde) que presenta el DAF luego de ser hidrolizado por las enzimas (Alvear *et al.*, 2007). Los resultados se interpolaron con la curva de calibración patrón con concentraciones de fluoresceína conocidos (1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80) y se calculó el DAF hidrolizado (fluoresceína producida $\text{mg/kg suelo}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Se determinó la actividad de dos enzimas tipo peroxidasa, la lignino peroxidasa (LiP) y la manganoso peroxidasa (MnP) teniendo en cuenta que el CBR presenta elementos que permiten el desarrollo de microorganismos nativos del suelo y por su porosidad es un microhábitat para los microorganismos propios del carbón que posiblemente tienen la capacidad de biotransformar CBR a través de la producción de estas enzimas extracelulares. También, se determinó la actividad de la enzima fenol oxidasa lacasa (Lac), debido a que en estudios de procesos de biotransformación de carbón se ha reportado que tanto los hongos como las bacterias son generadoras de estas enzimas. Para la medición de la actividad LiP se siguió el método propuesto por Fujian *et al.*, 2001 con modificaciones y se realizaron lecturas a una absorbancia a 310nm. La cantidad de LiP requerida para oxidar 1mmol de alcohol veratrílico por minuto se definió como una unidad de actividad enzimática 1UI. La actividad MnP, se determinó de acuerdo al método descrito por Paszcznsky *et al.*, 1986; una unidad de Mn se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar un μmol de Mn^{2+} a Mn^{3+} en un minuto. La actividad de las Lac se evaluó siguiendo el método propuesto Borbonnais *et al.*, 1995 y se definió 1UI como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1mmol de ABTS ($\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_4$) por minuto.

Para la determinación de parámetros químicos se aplicaron los siguientes métodos: el potencial de hidrogeniones (pH) se determinó con potenciómetro, la conductividad eléctrica (CE) con conductímetro; todas las mediciones se realizaron en pasta de saturación. El porcentaje de saturación de sodio (PSI) y la relación adsorción de sodio (RAS) se determinaron según los protocolos del laboratorio nacional de suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC, 2006). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) por el método de acetato de amonio 1 N y neutro en pasta de saturación y la densidad aparente se realizó por el método del cilindro (IGAC, 2006).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, diferencias mínimas significativas y en algunos casos se aplicó la prueba de promedios de Dunnet, previo análisis de los parámetros de normalidad de los datos. Adicionalmente, los datos correspondiente al sexto mes fueron sometidos a un análisis de componentes principales para datos categóricos (CATPCA), utilizando el programa de análisis estadístico SPSS versión 18 para evaluar la asociación entre las variables evaluadas.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Clasificación taxonómica del suelo

Según la clasificación taxonómica del suelo corresponde a un Salidic Calciustolls, que presenta problemas de degradación por salinización, está localizado en la parte baja del cuerpo del abanico

aluvial del Valle del Cesar. El suelo presentó las siguientes características diagnósticas: un epipedón mólico, endopedón cálcico, una saturación de bases de todo el perfil >50% y la C.E. > 30 dS/m (Anexos a, b, c y d).

2.4.2 Respiración de suelo

A los dos meses después de haberse iniciado el tratamiento del suelo con aplicación del CBR y las BSC (Figura 4) se observó un aumento en la respiración del suelo en los tratamientos C1%-*A.baumannii*, C1%-*B.mycooides* y C1%-Pool, presentando diferencias significativas ($P<0,05$) con respecto al control. En el cuarto mes en los tratamientos C1%-*A.baumannii*, C1%-*B.mycooides*, C1%-*Microbacterium* y en el pool de las 3 BSC se presentan valores de respiración similares y diferenciales con respecto al control. En el sexto mes los tratamientos C1%-Pool y C1%-*B.mycooides* tienden a descender; sin embargo, presentan diferencias significativas con respecto al control. El tratamiento C1%-*Microbacterium* sp. mantiene la tasa de respiración como en el cuarto mes mostrando diferencias con respecto al control, mientras que el tratamiento C1%-*A.baumannii* incrementa la respiración a diferencia del segundo y cuarto mes, mostrando diferencias significativas con respecto a todos los tratamientos y el control.

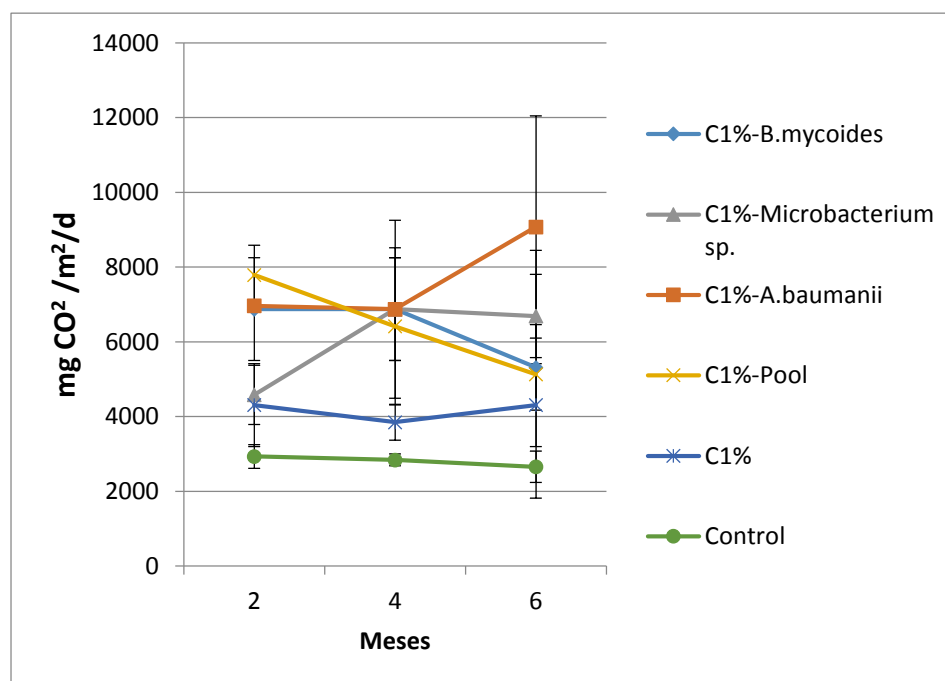


Figura 4. Respiración del suelo Salidic Calciustolls tratado con CBR y BSC en condiciones de campo. n=3

Por tanto, los resultados sugieren que la incorporación de CBR como materia orgánica humificada favorece la respiración del suelo a corto plazo, presentándose un mayor incremento cuando se realiza en conjunto con las BSC, especialmente cuando se realiza con *A. baumannii* que presentó el mayor incremento; esto puede atribuirse a la capacidad que tiene esta bacteria de solubilizar carbón, lo que indica un posible efecto por la liberación de SH que contribuyen a la formación de agregados del suelo (Piccolo, 2002) y sumado a esto el CBR posee una alta superficie específica y

porosidad (Levine *et al.*, 1982), lo que favorece la aireación y la retención de humedad estimulando el crecimiento de los microorganismos.

2.4.3 Actividad microbiológica

En la actividad microbiológica los resultados muestran que a los dos meses de haberse aplicado el CBR y las BSC, todos los tratamientos presentaron un incremento con respecto al control, con diferencias significativas ($p < 0,05$), mostrando mayor incremento los tratamientos C1%-Pool, C1%-*Microbacterium* sp., C1%-*B.mycooides* y C1%-*A.baumanii*, respectivamente (Tabla 6).

Tratamientos	Actividad Microbiológica (mg.kgsuelo ⁻¹ .h ⁻¹)		
	2 meses	4 meses	6 meses
C1%- <i>B.mycooides</i>	133,84±0,57	130,01±3,97	113,4±1,66
C1%- <i>Microbacterium</i> sp.	141,29±2,33	127,67±2,24	119,4±3,46
C1%- <i>A.baumanii</i>	127,73±4,32	108,01±7,38	97,95±10,1
C1%-Pool	147,67±2,18	129,67±3,47	127,17±4,04
C1%	102,56±3,28	99,84±0,29	92,4±1,27
Control	92,06±6,77	90,95±6,49	91,73±7,02

Tabla 6. Actividad microbiológica (mg.kg Suelo⁻¹.h⁻¹) del suelo Salidic Calciustolls a los 2, 4 y 6 meses de haber sido tratado con la adición de CBR y bacterias productoras de SH. Condiciones de campo. n=3

Estos resultados sugieren que la actividad microbiológica se estimula de manera temprana con la adición de CBR, lográndose obtener un mayor incremento de la actividad de los microorganismos cuando se aplica el CBR en conjunto con las BSC, lo que hace pensar que la solubilización de CBR por estas bacterias dan lugar a la liberación de SH (Valero *et al.*, 2014) que pueden ser aprovechadas por la microbiota nativa del suelo y los microorganismos presentes en el CBR favoreciendo la actividad microbiológica; hecho que se ve reflejado en la hidrólisis del DAF que mide la actividad enzimática de las poblaciones microbianas a pesar de que no es específico, debido a que es sensible a la actividad de otras enzimas como lipasas, esterasas y proteasas (Valero, 2013); sin embargo, puede proveer información estimada de los cambios en la actividad microbiológica (Green *et al.*, 2006) en el suelo salino-sódico ocasionados por la adición de CBR y las BSC, ya que ha sido utilizado en varios estudios como indicador de la calidad de los suelos en áreas degradadas en rehabilitación. Los resultados también concuerdan con lo encontrado por Valero (2013) en el tratamiento de materiales edáficos (materiales de suelos removidos durante la fase de pre-minería del carbón) con CBR y BSC, en donde CBR estimuló la actividad microbiológica en el suelo pero su efecto parecía ser independiente de la adición conjunta con las BSC.

A partir de los cuatro meses y hasta los seis meses se observó una tendencia al descenso de la actividad microbiológica en todos los tratamientos, posiblemente por las limitaciones del suelo

debido a la alta concentración de sodio que inhiben la actividad microbológica en el suelo (Gasca *et al.*, 2011).

2.4.4 Actividad de las enzimas ligninolíticas LiP, MnP y Lac

En la figura 5. Se evidencia un aumento temprano en la actividad de las enzimas LiP y MnP en el suelo salino sódico a los dos meses de haber sido tratado con CBR y las BSC. Esto se debe a que el CBR por ser de origen orgánico contiene elementos importantes para la nutrición microbiana como nitrógeno, azufre, hierro, carbono, oxígeno e hidrógeno, lo que hace que el CBR sea un sustrato utilizado como fuente de energía, favoreciendo la colonización y el crecimiento de las BSC, los microorganismos propios del CBR y la flora nativa del suelo salino sódico.

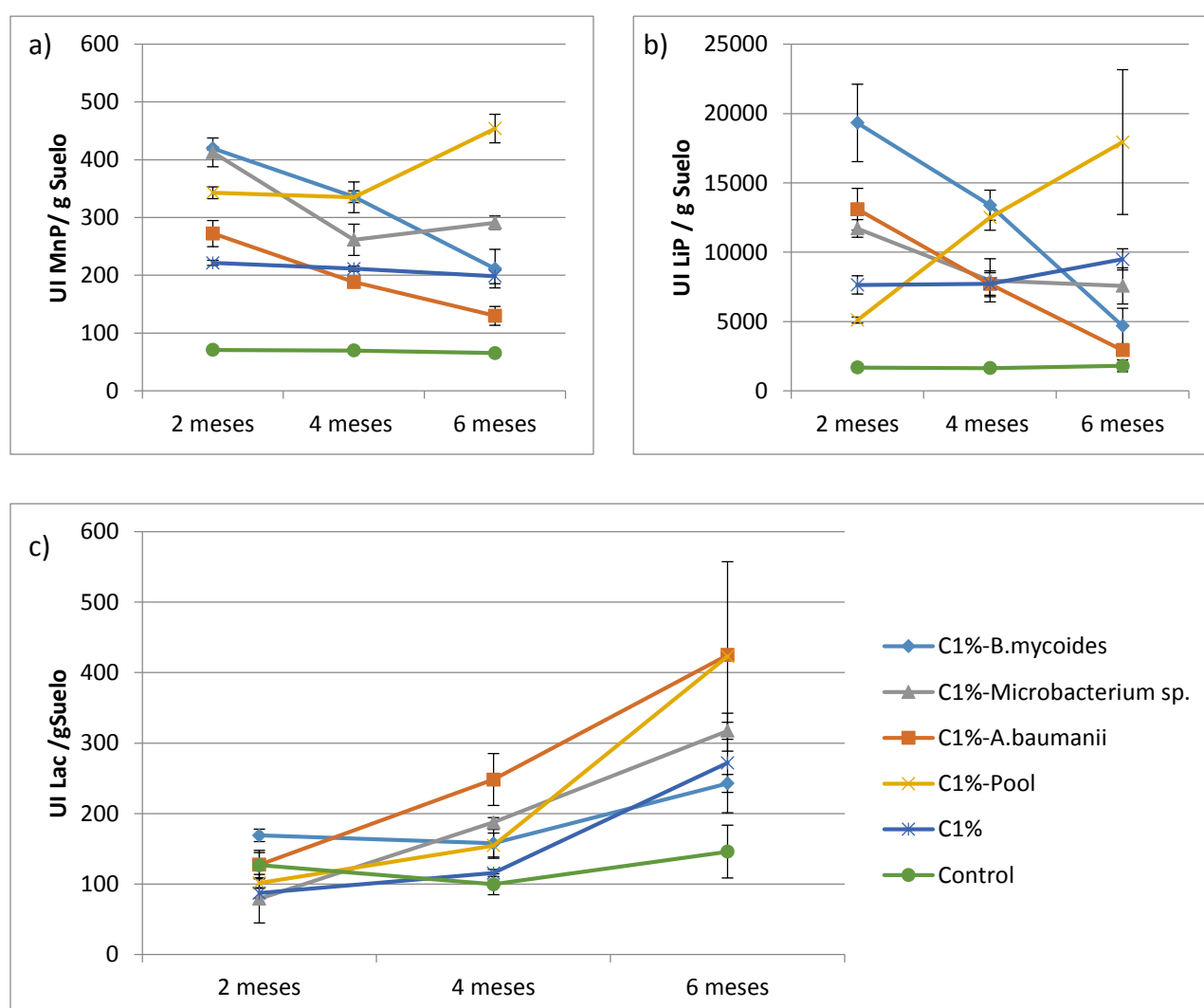


Figura 5. Actividad de las enzimas lignino peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas (Lac) en un suelo Salidic Calcistolls (UI/g Suelo) bajo condiciones de campo. n=3

Sin embargo, la actividad LiP y MnP no puede ser atribuida al efecto de la aplicación de las BSC, debido a que no se ha reportado la actividad de enzimas peroxidasas (LiP y MnP) en procariontes, lo que hace pensar que la actividad ligninolítica sea realizada por hongos que se encuentran en los espacios porosos del CBR y los hongos nativos del suelo salino-sódico, que pueden generar las enzimas extracelulares LiP y MnP para la biotransformación del CBR (Fakoussa y Hofrichter, 1999). En la Figura 5b se observa que a los 4 y 6 meses de haber sido tratado el suelo con CBR y las BSC, la actividad LiP se ve disminuida en la mayoría de los tratamientos y esto posiblemente se deba a que algunos microorganismos pueden inducir la actividad MnP (Figura 5a) e inhibir la actividad LiP (Hofrichter y Fritsche, 1997).

En todos los tratamientos se logra evidenciar un incremento de la actividad de las enzimas Lac en el cuarto y sexto mes después de haber sido aplicado en el suelo salino-sódico el CBR y las BSC, mostrando diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control. Los resultados sugieren que la aplicación de C1%-*A. baumannii* estimula la actividad Lac, mostrando mayores resultados durante el cuarto y sexto mes del experimento, este tratamiento presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control (Figura 5c); el siguiente tratamiento con mayor eficiencia a largo plazo (a los seis meses) fue el C1%-pool mostrando el efecto conjunto de los microorganismos sobre la actividad Lac. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que algunas bacterias han sido reportadas con actividad Lac (Madhavi y Lele, 2009; Diamantidis *et al.*, 2000) y si las BSC utilizadas en el experimento transforman CBR mostrando una mayor actividad al aplicarlas al suelo salino-sódico, sugiere evidencia de que dichas BSC presenten actividad Lac, especialmente *Acinetobacter baumannii*, también puede ser que la actividad Lac esté asociada a bacterias y hongos que posiblemente se encuentren en el CBR utilizado en el experimento o en la microbiota nativa del suelo.

2.4.5 Variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo

Según Dunnet, en el pH no se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) durante los 6 meses del experimento en invernadero (Tabla 7). En cuanto a la CE en los diferentes tratamientos exceptuando el control, se logró evidenciar un ligero aumento a través del tiempo. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en algunos tratamientos (C1%-Pool, C1%, C1%-*A. baumannii*, C1%-*Microbacterium* sp y C1%-*B. mycoides*) con respecto al control; en el cuarto mes se observó que solo los tratamientos C1%-Pool, C1%, C1%-*A. baumannii* mantienen diferencias significativas con respecto al control, y en el sexto mes se encontró comparado con el control una mayor disminución de la CE en el suelo al ser tratado únicamente con CBR presentando diferencias significativas. Estos resultados permiten demostrar el efecto que tiene la adición de CBR solo en el suelo salino sódico, y en conjunto con las BSC sobre la CE. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Vance *et al.* (1998), que al aplicar materia orgánica con yeso en la superficie de un suelo Natrixeralf lograron disminuir la CE si se compara con un suelo control sin tratamiento.

Tratamientos	pH			CE (<u>dS.m</u>)			RAS (<u>mmol/dm³</u>)			PSI (%)		
	Meses											
	2	4	6	2	4	6	2	4	6	2	4	6
C1%- <i>B.mycoides</i>	10,0±0,15	9,9±0,05	9,8±0,20	5,3±0,90	5,2±0,72	5,5±0,05	21,6±0,91	21,6±0,30	32,2±0,51	32,3±5,96	37,3±2,85	59,9±1,12
C1%- <i>Microbacterium</i> sp.	9,8±0,40	9,8±0,26	9,8±0,15	5,1±0,61	5,1±0,51	5,5±0,76	34,2±1,05	34,2±0,41	35,1±8,4	37,3±0,65	37,3±1,34	55,8±0,72
C1%- <i>A.baumannii</i>	9,5±0,20	9,8±0,20	9,7±0,15	4,3±1,15	4,8±0,87	5,1±0,35	23,0±1,83	23,0±2,91	46,5±3,10	33,6±19,8	33,6±19,5	50,5±18,43
C1%-Pool	9,8±0,20	9,8±0,10	9,8±0,11	3,8±0,72	4,4±0,55	5,2±0,72	22,4±8,22	26,3±8,15	44,4±4,62	55,5±3,10	55,5±3,38	58,7±3,02
C1%	9,6±0,23	9,7±0,15	9,8±0,05	4,2±0,20	4,5±0,05	4,8±0,05	24,4±3,32	24,4±2,02	31,5±3,16	46,0±13,8	46,0±12,7	59,5±12,50
Control	10,0±0	10,3±0,11	10,4±0	7,9±0	7,9±0,05	7,9±0,15	56,8±0,51	56,8±0,55	56,8±0,26	61,2±1,74	61,2±0,32	61,2±0,66

Tabla 7. Respuesta de las variables químicas asociadas a la salinidad sódica del suelo y la densidad aparente (Da) del suelo salino-sódico al ser tratado con CBR y BSC bajo condiciones de campo. n=3 Conductividad eléctrica (CE), Relación adsorción de sodio (RAS), Porcentaje de saturación de Sodio (PSI).

En cuanto al RAS y el PSI, los resultados de los diferentes tratamientos mostraron cambios significativos en ambas variables por la adición de CBR y las BSC en el suelo salino sódico, observándose disminución después de haber iniciado el experimento durante los 6 meses en el RAS; en tanto que en el PSI se observó disminución en el segundo y cuarto mes, presentando un mayor decrecimiento en el tratamiento C1%-*A.baumannii*. También se evidenció que cuando el CBR se aplica solo se logra una mayor disminución del RAS. Los resultados anteriores difieren de lo reportado por Gasca *et al.*(2011), que al aplicar vinaza como enmienda orgánica en un suelo Petrocalcic Natrustalf no evidenció cambios significativos en el RAS y PSI; sin embargo, logró evidenciar una disminución en el sodio intercambiable.

2.4.6 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico.

En respuesta a la aplicación de CBR y las BSC en el suelo salino-sódico, la CIC se vio aumentada a lo largo del experimento, comparando con el control, hecho que se ve reflejado a corto plazo (Tabla 8). Lo que permite evidenciar el efecto del CBR como materia orgánica humificada que estimula favorablemente la CIC, debido a que el CBR posee una alta CIC y permite el crecimiento de las BSC aplicadas y los microorganismos nativos del suelo que pueden solubilizar el CBR y dar lugar a la liberación de SH las cuales actúan como polielectrolitos que estimulan la CIC (Janos *et al.*, 2011). En la Da no se logró observar cambios significativos (Tabla 8), lo que coincide por lo reportado por Zuñiga *et al.*, 2011 que afirmó que los cambios que ocasiona la materia orgánica en el suelo sobre propiedades físicas se observa a largo plazo.

Tratamientos	CIC (<u>cmol</u> (+)/Kg)			Da g/cm ³
	2	4	6	6
C1%- <i>B.mycoides</i>	9,1±1,02	9,2±0,64	9,1±0,52	1,54±0,02
C1%- <i>Microbacterium</i> sp.	9,4±1,33	9,3±0,72	9,1±0,75	1,51±0,00
C1%- <i>A.baumannii</i>	9,0±1,19	9,0±1,20	9,0±0,85	1,42±0,01
C1%-Pool	9,4±0,34	9,3±0,26	9,1±0,51	1,51±0,00
C1%	9,5±0,40	9,2±0,36	9,1±0,30	1,54±0,01
Control	7,4±1,08	7,4±0,05	7,4±0,45	1,62±0,01

Tabla 8. Determinación de la CIC en el suelo Salidic Calciustolls tras ser tratado con CBR y las BSC en condiciones de campo. n=3.

El análisis de componentes principales para datos categóricos (CATPCA) realizado para establecer la asociación entre las variables evaluadas en el sexto mes después de haberse iniciado la aplicación de CBR y las BSC, logro explicar el 57% de la variabilidad de los datos, un 39% en el componente 1 y el 18% en el componente 2 (Figura 6b). Las variables mas influyentes en el componente 1 fueron el CBR, la actividad de las enzimas LiP, MnP, Lac, respiración, pH, C.E., CIC y la Da, mientras que en el componente 2 fueron el Pool de las tres BSC y el PSI (Figura 6c).

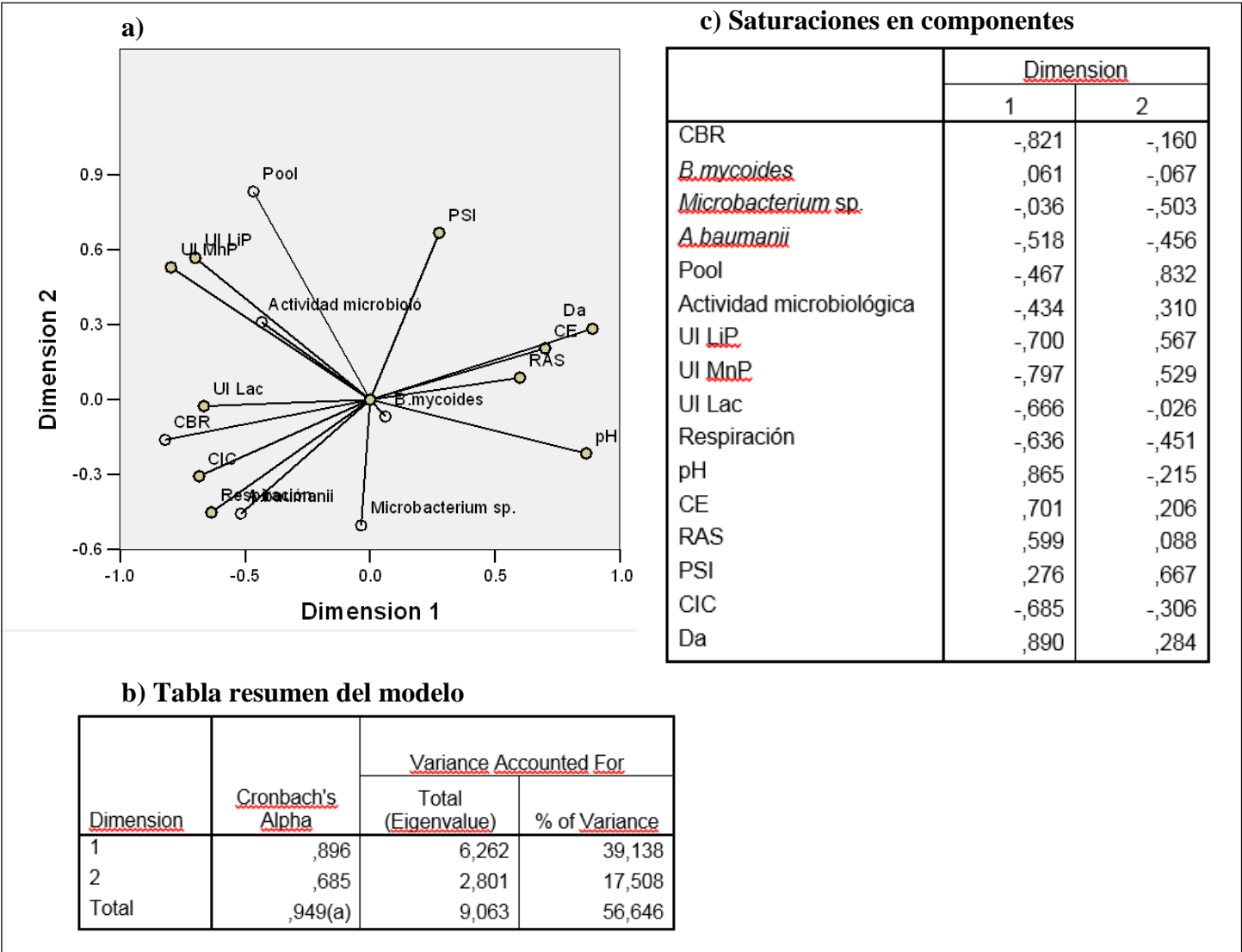


Figura 6. Análisis (CATPCA). Asociación de las variables evaluadas en el suelo Salidic Calciustoll tratado con la adición de CBR y BSC en condiciones de campo.

Obsérvese en la Figura 6a una asociación entre los siguientes grupos de variables: 1) La actividad de las enzimas LiP, MnP, la actividad microbiológica y el pool de las tres BSC, lo que indica que la aplicación del pool de las tres BSC favorece la expresión conjunta de peroxidasas ligninolíticas y la respuesta se ve reflejada en el aumento de la actividad microbiológica; esto es posible ya que las BSC pueden biotransformar el CBR dando lugar a la liberación de sustancias húmicas que

estimulan tal vez la actividad de los microorganismos nativos del suelo o la microbiota acompañante del CBR. 2) La actividad de las enzimas Lac, CBR, CIC, respiración y *A.baumannii*, lo que permite demostrar que la aplicación del CBR en conjunto con *A. baumannii* favorece la respiración del suelo y la producción de enzimas Lac las cuales son generadas por bacterias y es posible que actividad de las enzimas Lac es posible que sea por *A. baumannii* debido a que posee la capacidad de biotransformar CBR. El CBR favorece la CIC por lo que en si mismo posee una alta CIC debido a la presencia de grupos fenólicos y carboxílicos (Janos *et al.*, 2011). 3) Correlación entre la Da y los parámetros de salinidad C.E., RAS, pH, lo que indica que la salinidad influye de manera negativa sobre la Da.

2.5 Conclusiones

La adición de CBR a razón de 5 kg/m² influyó favorablemente en las propiedades químicas y biológicas del suelo salino-sódico en condiciones de campo. No se observaron cambios significativos en la Da por lo que el efecto del CBR sobre propiedades físicas suele ser a largo plazo.

El CBR contribuyó al mejoramiento de las propiedades químicas del suelo salino sódico, disminuyendo la C.E., el RAS y el PSI a excepción del pH, obteniéndose una mayor disminución a corto plazo al adicionar CBR con las BSC.

La aplicación de CBR aumentó la actividad biológica del suelo Salidic Calciustolls incrementando la respiración, la actividad microbiológica y la CIC del suelo, lográndose un mayor efecto cuando el CBR se adiciona con las BSC, especialmente con el inóculo de *A. baumannii*.

La incorporación del CBR y la solubilización de carbón mediada por las BSC favorece expresión conjunta de peroxidasas ligninolíticas de la microbiota nativa del CBR y del suelo salino-sódico.

3. Conclusiones y recomendaciones

3.1. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten inferir que la incorporación de CBR como materia orgánica humificada en un suelo salino sódico influye en el mejoramiento de algunas propiedades químicas y biológicas del suelo.

La adición de CBR al 1% en el suelo salino-sódico bajo condiciones de invernadero incrementa la respiración, la actividad microbiológica y la CIC e incide favorablemente en la disminución de la C.E., RAS y el PSI en el suelo a corto plazo.

El tratamiento de un suelo salino sódico en campo con CBR a razón de 5 kg/m² contribuye a la disminución de la C.E., RAS y PSI, e incrementa la actividad biológica; hecho que se ve reflejado en el aumento de la respiración, la hidrólisis del diacetato de fluoresceína, la actividad de las enzimas LiP, MnP y Lac, y la CIC, caso contrario a lo sucedido en la Da que no mostro cambios significativos.

El efecto del CBR en el suelo salino sódico bajo condiciones de invernadero y en campo es mayor cuando se aplica en conjunto con las BSC, reflejado en una mayor actividad biológica, la actividad de las enzimas ligninolíticas e incremento de la CIC, y también contribuyó a una disminución mayor en la C.E, RAS y PSI del suelo.

3.2. Recomendaciones

Los resultados de esta investigación permiten sugerir el aprovechamiento del CBR dentro de un contexto ambiental y agrícola, teniendo en cuenta que el CBR es considerado un residuo de la explotación minera la cual se realiza a gran escala en el departamento del Cesar, se podría utilizar como una enmienda orgánica coadyuvante para la recuperación de suelos degradados por salinidad, lo cual es un problema común en un 38,44% en los suelos del Cesar.

ANEXO A. Descripción del suelo salino-sódico

CALICATA

Fecha: 01 Septiembre de 2012

TAXONOMIA: Salidic Calciustolls

Unidad cartográfica: consociación Villa Mary VMa

Localización: departamento del Cesar, municipio de Valledupar, km 7 vía la paz, Centro Biotecnológico del Caribe Lote 9.

Coordenadas geográficas: latitud 10°23'55 66''N longitud 73°13'47 06''O

Altura: 168 m.s.n.m

Geomorfología: paisaje piedemonte, tipo de relieve abanico aluvial, forma del terreno cuerpo del abanico.

Material parental: Sedimentos aluviales finos y medios, muy alterado.

Relieve: plano, ligeramente disectado

Pendiente: ligeramente plana (1-2%), longitud larga (>150 metros), forma: rectilínea.

Clima ambiental

Piso térmico: cálido seco.

Temperatura promedio anual: 28,4°C, precipitación promedio anual: 961mm/año, distribución (conseguir balance hídrico)

Formación ecológica según Holdrige: Bosque seco tropical (bs-T).

Clima ambiental según Koeppen: Tropical lluvioso de bosque (Ami)

Clima edáfico. Régimen de temperatura: Isohipertérmico, régimen de humedad: Ústico.

Erosión: no hay; movimientos en masa: no hay.

Degradación: salinización en superficie.

Afloramientos rocosos: no hay.

Drenaje interno: lento; externo: lento; drenaje natural: bien drenado

Nivel freático: No observado.

Profundidad: muy profunda.

Uso actual: pastos estrella, ganadería semiintensiva (Gyr y Guzerat).

Características diagnosticas:

Horizontes: Epipedón: Mólico Endopedón: Cálcico; saturación de bases de todo el perfil >50%; C.E. > 30 dS/m

Orden: Molisol

Suborden: Ustoll

Gran grupo: Calciustoll

Subgrupo: Salidic Calciustolls

Familia: Franca, mezclada isohipertérmica.

Describió: Juan Guillermo Cubillos, Yolanda Rubiano, Nelson Valero.

00–11cm A₁	Color en húmedo pardo oscuro (7.5 YR 3/2); Textura fanco arcillo arenosa; sin estructura, masiva; consistencia en húmedo muy firme, en mojado ligeramente pegajosa y ligeramente plástica; frecuentes poros medianos y gruesos, vesiculares e irregulares, continuos; frecuentes raíces finas y medias, vivas, distribución normal en el horizonte, imped y exped; poca actividad de macroorganismos; reacción violenta al HCl; límite difuso, ondulado; pH muy fuertemente alcalino (9.1).
11–32cm A₂	Color en húmedo pardo (10YR 4/3); textura franco arcillosa; fragmentos de gravilla 3%; estructura primaria columnar, gruesa, bien desarrollada, secundaria blocosa subangular, media y fina, fuertemente desarrollada; consistencia en húmedo firme, en mojado ligeramente pegajosa y ligeramente plástica, pocos nódulos y concreciones de carbonatos, redondeadas, irregulares y finas de consistencia blanda con distribución irregular, color pardo muy pálido (10YR 8/4); poros frecuentes finos y medianos, vesiculares e irregulares continuos; frecuentes raíces finas y medias, vivas, bien distribuidas en el horizonte; poca actividad de macroorganismos; reacción fuerte a HCL; límite difuso, ondulado; pH muy fuertemente alcalino (10.1).
32–49cm AB_k	Color en húmedo pardo oscuro (10YR 3/3) 60% y pardo amarillento oscuro (10YR 4/4) 40%; textura franco gravillosa (30%), estructura blocosa subangular fina, fuertemente desarrollada; consistencia en húmedo muy firme, en mojado pegajosa y plástica, muchas concreciones y nódulos de carbonatos, redondeadas, irregulares y gruesas, consistencia dura con distribución irregular, color pardo muy pálido (10YR 8/4); frecuentes poros medianos, vesiculares e irregulares; pocas raíces vivas finas y medias, normalmente distribuidas, no hay actividad de macroorganismos; límite difuso, ondulado; reacción fuerte a HCL; pH muy fuertemente alcalino (10.1).
49cm–84cm B_k	Color en húmedo pardo amarillento (10YR 5/6); textura franco gravillosa (13%), estructura blocosa subangular fina y débil, consistencia en húmedo friable, en mojado no pegajosa y no plástica, frecuentes nódulos y concreciones, compuesta de carbonatos, redondeadas, irregulares y medias de consistencia dura, distribución irregular, color pardo muy pálido (10YR 8/4); frecuentes poros medianos, vesiculares e irregulares; pocas raíces vivas finas y medias, distribuidas normalmente, no se evidencia actividad de macroorganismos; límite difuso, ondulado, reacción fuerte a HCL; pH muy fuertemente alcalino (9.9)
84–127cm C_r	Color en húmedo pardo amarillento (10 YR 5/8) textura franca arenosa, sin estructura suelta, muchos poros finos y medianos, vesiculares e irregulares, pocas raíces vivas finas y medias, distribuidas normalmente, no se evidencia actividad de macroorganismos; límite irregular; pH muy fuertemente alcalino (8.6).
127 – 150x 2AB	Color en húmedo pardo oscuro (7.5 YR 3/2); textura franco arcillosa, estructura primaria blocosa subangular media y débil, secundaria columnar subangular, media y fina, fuertemente desarrollada; consistencia en húmedo firme, en mojado ligeramente pegajosa y ligeramente plástica; frecuentes

	poros medianos, vesiculares e irregulares; pocas raíces vivas finas y medias, distribuidas normalmente, no se evidencia actividad de macroorganismos; límite difuso ondulado, pH muy fuertemente alcalino (8.6).
--	--

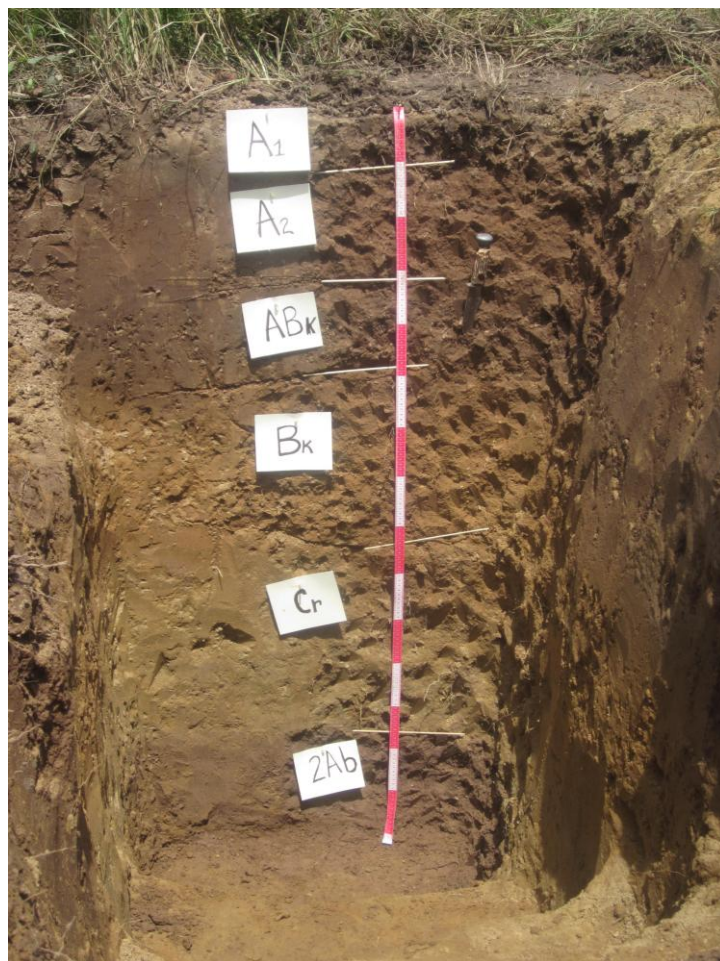


Figura 7. Perfil del suelo Salidic Calcistolls

ANEXO B. Resultados del análisis granulométrico del suelo Salidic Calciustolls

Horizonte/ Profundidad (cm)	Granulometría			Clase textural	Gravilla %	pH	*CaCO ₃ Cualitativo	Materia orgánica C.O %	Complejo de Cambio (cmol(+)/kg)					
	Arena %	Limo %	Arcilla %						CIC	Ca	Mg	K	Na	BT
A1 00-11	48,4	27,4	24,2	FArA		9,1	(++++)	0,64	11,3	11,7	2,2	0,82	9,2	23,9
A2 11-32	42,2	29,5	28,3	FAr		10,0	(+++)	0,11	13,1	7,4	1,6	0,71	15,6	25,3
ABk 32-49	36,4	39,5	24,1	F		10,1	(++++)	0,01	9,8	11,8	2,2	0,35	13,2	27,6
Bk 49-84	42,8	39,1	18,1	F	13,0	9,9	(++++)	0,04	6,0	10,5	1,8	0,12	8,5	20,9
Cr 84-127	72,6	17,3	10,1	FA		8,6	(+)	0,02	4,8	7,3	3,3	0,07	0,63	11,6

* Niveles CaCO₃: (+) = Bajo; (++) = Medio; (+++) = Alto; (++++) = Muy alto; (-) = No presente; *meq Calcio/100g (cmol(+)/kg) x 200 = mg/kg. ; *meq Potasio/100g (cmol(+)/kg) x 391 = mg/kg. ; *meq magnesio/100g (cmol(+)/kg) x 120 = mg/Kg. ; *meq sodio/100g (cmol(+)/kg) x 230 = mg/kg. :Porcentaje (%) = mg/kg / 10.000 A = Arena; L = Limo ; Ar = Arcilla; F = Franco . ; *SAT = Saturado; B.T. = Bases totales; *S.B.% = Porcentaje Saturación de Bases; PSI = Porcentaje Saturación de Sodio.

ANEXO C. Resultados del análisis químico en pasta de saturación del suelo Salidic Calciustoll

Horizonte/ Profundidad (cm)	Pa (%)	CE (dSm)	RAS	PSI	Clase	Cationes mmol(+)/L					CaCO ₃	
						Ca	Mg	K	Na	Suma	Cualitativo*	Cuantitativo %
A1 00-11	85,6	7,9	56,8	62,8	NaS1	0,19	0,19	0,29	25,0	35,7	(++++)	
A2 11-32	77,2	7,9	134	93,1	NaS1	0,7	0,4	0,14	30,9	31,2	(+++)	

ANIONES mmol(+)/L					cmol(+)/kg	
Sulfatos	Cloruros	Carbonatos	Bicarbonatos	Suma	CIC	Sodio
3,8	14,7	4,5	2,9	25,8	11,3	7,1
7,6	6,0	11,9	3,1	28,5	13,1	12,2

* Niveles CaCO₃: (+) = BAJO; (++) = MEDIO; (+++) = ALTO; (+++++) = MUY ALTO; (-) = NO PRESENTE. ; *Pa: Porcentaje saturación de agua. ; *RAS: Relación adsorción de sodio. ; *Porcentaje (%) = ppm / 10.000. ; *CE: Conductividad eléctrica (dS/m) . ; *PSI: Porcentaje saturación de sodio. ; *CIC: Capacidad de intercambio catiónico. ; S1: Moderadamente salino (CE 4-8) S2: Fuertemente salino (CE 8-16) *S3: Muy fuertemente salino (CE > 16). ; *Na: Sódico (PSI > 15) N: *Normal).

ANEXO D. Resultados del análisis mineralógicos del suelo Salidic Calciustolls

Constitución	Horizonte/Profundidad (cm)		
	A2 11-32 (cm)	Bk 49-84 (cm)	Cr 84-127 (cm)
Interestratificados	tr	tr	tr
Integrados 2:1-2:2	++	++	
cloritas	+	++	
micas	+++	++	++
caolinita	++	+++	+++
Cuarzo	tr	+	tr
Feldespatos	+	tr	+
Esmeectitas (montmorillonita)	tr	+	
Gibsita			+++

*Convenciones : ++++ Dominante (>50%); +++ Abundante (30-50%); Común (15-30%); + Presente(5-15%), TR trazas(<5%); ?= Dudoso; N.D = no detectado; N.A = no aplica; N.E = no especifica.

Bibliografía

- Adam, G. and Duncan, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33: 943-951.
- Alvear M., Urra, C., Huaiquilao, R., Astorga, M., Reyes, F. 2007. Actividades biológicas y estabilidad de agregados en un suelo del bosque templado Chileno bajo dos etapas sucesionales y cambios estacionales. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 7 (3): 38-50.
- Bandeira, M., Mosca, G., Vamerali, T. 2009. Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.) in metal-polluted wastes. *Desalination* 246: 78-91.
- Bourbonnais, R., Paice, M., Reid, I., Lanthier, P. and Yaguchi, M. 1995. Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,29-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline- 6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology.* 61 (5)1876-1880.
- Celis, J., Sandoval, M., Zagal, E. 2009. Actividad respiratoria de microorganismos en un suelo patagónico enmendado con lodos salmonícolas. *Arch Med Vet* 41: 275-279.
- Chassapis, K., Roulia, M. 2008. Evaluation of low-rank coals as raw material for Fe and Ca organomineral fertilizer using a new EDXRF method. *Int. J. Coal Geol.* 75: 185-188.
- Chen, Y., Aviad, T. Humic Substances in Soil and Crop Sciences. 1990. In: Effects of Humic Substances on Plant Growth; Mac Carthy, P.; Clapp, C. E.; Malcolm, R. L.; Bloom, P. R., eds.; American Society of Agronomy and Soil Science Society of America: Madison, Wisconsin.
- Christanis, K., Giannouli, A., Kalaitzidis, S., Katur, J., Böcker, L., Petrakis, G. 2006. Application of soil-improving media produced on lignite-basis on the rehabilitation of post- mining sites. *Mineral Wealth* 140: 43-55.
- Clavero C., Razz, G. 2002. Efecto de la salinidad en el crecimiento de *Gliricidia sepium*. *Revista Científica* 12 (2) 517-518.
- Delgado, H. M. Los Microorganismos Del Suelo En La Nutrición Vegetal. 2004. Editorial Springer. Capítulo 6: 116-234.

- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R. (2000). Purification and characterization of the first bacterial laccase in rhizospheric bacteria, *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 919-927.
- Dorronsoro, C. 2001. Curso salinidad de suelos. Universidad de Granada España. En: www.edafologia.ugr.es
- Fakoussa, R. M. and Hofrichter, M. 1999. Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 25-40.
- FAO. 2000. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management.
- Filip, Z., Kubát, J. 2001. Microbial utilization and transformation of humic substances extracted from soils of long-term field experiments. *Eur. J. Soil Biology* 37: 167-174.
- Fujian, X., Zhang, C.H., Zuohn, L., 2001. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam exploded straw as substrate. *Biores. Technol.* 80, 149–151
- Gasca, C., Menjivar J., Torrente A. 2011. Cambios en el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y la relación de absorción de sodio (RAS) de un suelo y su influencia en la actividad y biomasa microbiana. *Acta Agronómica* 60 (1) 27-38.
- Greena, V.S., Stottb, D. E., Diacka, M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 693–701.
- Grinhut, T., Meir, S., Chen, Y., Hadar, Y. 2011. Involvement of ligninolytic enzymes and Fenton-like reaction in humic acid degradation by *Trametes sp.* *Appl. Microbiol Biotechnol* 91:1131-1140.
- Gockay, C., Kolankaya, N., Dilek, F. 2001. Microbial solubilization of lignites. *Fuel*. 80: 1421 -1433.
- Gómez, D. (2004). Recuperación de espacios degradados. Madrid España: Ediciones Mundiprensa. 585p.
- Goykovic Cortés, V., Saavedra del Real, G. 2007. Algunos efectos de la salinidad en el cultivo del tomate y prácticas agronómicas de su manejo. *Idesia (Arica)*, 25(3), 47-58
- Hernández, O., 2000. Uso de métodos químicos y biológicos como mejoradores de la conductividad hidráulica de un suelo salino sódico. Tesis de doctor en Ciencias Área Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima. Colima, México.

- Hofrichter, M., Fritsche, W. 1996. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems I. Screening for low rank coal depolymerizing activities of *Nematoloma frowardii* b19 Appl. Microbiol. Biotechnol. 46:220-225.
- Hofrichter, M., Fritsche, W. 1997. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems II. The ligninolytic enzymes of the coal-humic-acid-depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b19. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 419-424.
- Hofrichter, M., Fakoussa R. 2004. Microbial degradation and modification of coal. In: Steinbüchel, A. Ed. Biopolymers I. Lignin, humic substances and coal. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. 399 -425p.
- Hofrichter, M., Ziegenhagen, A., Sorge, A., Ullrich, A., Bublit, A., Fritsche, W. 1999. Degradation of lignite (low-rank coal) by ligninolytic basidiomycetes and their manganese peroxidase system. Appl Microbiol Biotechnol. 52: 78-84.
- Hölker, U., Schmiers, H., Grobe, S., Winkerhofer, M., Polzakiewicz, M., Ludwig, S. Dohse, J. and Hofer, M. 2002. Solubilization of low-rank coal by *Trichoderma atroviridae*: Evidence for the involvement of hydrolytic and oxidative enzymes by using ¹⁴C-labelled lignite. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 28: 207 -212.
- Instituto Colombiano de Geología y Minería – INGEOMINAS. 2007. El carbón colombiano recursos, reservas y calidad.. Bogotá D.C., Colombia. 5-7p.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación - ICONTEC. (2000). NTC 2455. Desinfectantes. Limpiadores líquidos. Desinfectantes para uso doméstico. Tercera actualización. 25-10-2000
- Instituto Geografico Agustin Codazzi - IGAC. 1984. Estudio general de suelos de los municipios de Valledupar, Bosconia, El Copey y El Paso. Bogotá D.C.
- Instituto Geografico Agustin Codazzi - IGAC. 2006. Métodos analíticos del laboratorio de suelos. Imprenta Nacional de Colombia. 6 ed. Bogotá D.C., Colombia
- Instituto Mundial del Carbón. 2005. El carbón como recurso. Una visión general del carbón. World Coal Institute. Reino Unido.
- Janos, P., Závodská, L., Lesný, J., Kříženecká, S., Synek, V., Hejda, S., Kub, M. 2011. Young Brown Coals for Environmental Applications: Composition, Acid-Base, Ion-Exchange, and Sorption Properties of Selected Central European Coals. In: Coal Extraction. James J. Stewart Ed. Nova Science Publishers; Hauppauge N.Y. p. 71-90.

- Khaled H., Fawy H. 2011. Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content, Plant Growth, and Soil Properties under Conditions of Salinity. *Soil & Water Res.*, Vol 6 (1): 21–29
- Krebs, L. 2003. Respiración del suelo como herramienta para evaluar calidad de fondos en acuicultura. I. Desarrollo de un protocolo estándar para medir dióxido de carbono. Tesis de maestría. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil – Ecuador.
- Laborda, F., Fernandez, M., Luna, N., Monistrol, Y. 1997. Study of the mechanisms by which microorganisms solubilize and/or liquefy Spanish coals. *Fuel Processing Technology* 52(1-3): 95-107.
- Levine, D., Schlosberg, R., Silbernagel, B. 1982. Understanding the chemistry and physics of coal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(10). 3365-3370.
- Machnikowska, H., Pawelec, A., Podgorska, A. 2002. Microbial degradation of low rank coals. *Fuel Processing Technology* 77-78: 17-23
- Madhai V., Lele S.S. 2009. Laccase: Properties and applications. *Bioresources* 4 (4): 1694-1717.
- Más, E. y O. García-Molinari. 2006. Guía Ilustrada de Yervas Comunes en Puerto Rico. En: <http://issuu.com/sea-upr/docs/manualpastos> 2da. Edición ampliada y revisada grupo de trabajo STDF, 2013
- Metternicht, G.I. and Zinck, J.A. (2003). Remote sensing of soil salinity: Potentials and constraints. *Remote Sensing of Environment*, 85(1), 1-20.
- Mora, J. 2006. La actividad microbiana un indicador integral de la Calidad del suelo. *Luna azul*. 5 (6): 1-6.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: ringing them together. *New Phytologist*. 167 (3): 645-660. en Goykovic, V & Saavedra, G. 2007. Some effects of salinity on the tomato cultivars and agronomic practices in its managing. *IDESIA* 25, (3) 47-58.
- Nardi, S. Pizzeghello, D. Muscolo, A. Vianello, A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol Biochem.* 34:1527-1536.
- NutraNetics, 2000. Inc. Humic Acid Structure and Properties. Nutranetics ProBio Systems. Junio 2000. http://www.phelpstek.com/resources/pdfs/humic_acid.pdf

- Otero J., C. Gómez, R. Sánchez. 2002. Zonificación de los procesos de salinización de los suelos de Colombia. IDEAM.
- Paszczyński, A., Huynh, V., & Crawford, R. 1986. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Biochemistry and Biophysics.
- Peña, E., Havel, J., Patocka, J. 2005. Humic substances Compounds of still unknown structure applications in agriculture, industry, environment and biomedicine. Rev. Journal of applied Biomedicine. 3: 13-24.
- Piccolo A. 2001. Supramolecular humic structure in environment. Soil science. 166 (11): 810-832.
- Piccolo, A. 2002. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. Adv. Agron. 75: 57–154.
- Piccolo, A. and Mbagwu, J. S. 1999. Role of hydrophobic components of soil organic matter on soil aggregate stability. Soil Sci. Soc. Am. J. 63:1801-1810.
- Pokorný, R., Olejníková, P., Balog, M. 2005. Characterization of microorganisms isolated from lignite excavated from the Záhorie coal mine (southwestern Slovakia). Research in Microbiology 156: 932–943.
- Ralph, J., Catcheside, D. 1994. Depolymerisation of macromolecules from Morwell brown coal by mesophilic and thermotolerant aerobic microorganisms. Fuel Processing Technology 40 (2-3):193-203.
- Rojas, D. (2008). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp.* Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
- Rumpel, C., Kogel-Knabner, I. 2002. The role of lignite in the carbon cycle of lignite-containing mine soils: evidence from carbon mineralization and humic acid extractions. Organic Geochemistry. 33: 393-399.
- Schnürer J., Rosswall T. 1982. Fluorescein hydrolisis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Appl. Env. Microbiol., 43: 1256-1261.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. 1996. In: Piccolo, A. (Ed.), Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 531–593.

- Senesi, N., Plaza, C., Brunetti, G., Polo, A. 2007. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 1244–1262.
- Sharif, M. 2002. Effect of lignite coal derived humic acid on growth and yield of wheat and maize in alkaline soil. Tesis para optar título de doctor en suelo y ciencias ambientales. Agricultural University Peshawar.
- Siong, Sim F. Lau Seng, Norrafidah Bt Majri and Haslinda Bt Mat. 2007. A Comparative Evaluation on the Oxidative Approaches for Extraction of Humic Acids from Low Rank Coal of Mukah, Sarawak. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 18, No. 1, 34-40.
- Tao, X.X., Pan, L.Y., Shi, K.Y., Chen, H., Yin, S.D. and Luo, Z. F. 2009. Bio-solubilization of Chinese lignite I: extra-cellular protein análisis. *Mining Science and Technology*. 19: 0358–0362.
- Tejada, M., Gonzalez, J. L. 2007. Influence of organic amendments on soil structure and soil loss under simulated rain. *Soil Tillage Res.* 93, 197–205.
- Valero, N. 2013. Transformación microbiana de carbon de bajo rango para inducer cambios en las propiedades del suelo. Tesis para optar título de doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Valero, N., Beleño, J., Mancilla, S. 2011. Biotransformación de carbón de bajo rango por bacterias aisladas de microhábitats influenciados por residuos de carbón. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(1): 58-65.
- Valero, N., Gómez, L., Pantoja M., Ramirez, R. 2014. Production of humic substances through coal-solubilizing bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45 (3) In press
- Valero, N., Rodríguez, L.N., Mancilla, S., Contreras, L. 2012. Obtención de bacterias biotransformadoras de carbón de bajo rango a partir de microhábitats con presencia de residuos carbonosos. *Acta biológica Colombiana* 17(2): 335-348.
- Vance, W.H., Tisdell, J.M., McKenzie, B.M., 1998. Residual effects of surface application of organic matter and calcium salts on the sub-soil of a red-brown earth. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 595–600.
- Willmann, G., Fakoussa, R. 1997. Biological bleaching of water-soluble coal macromolecules by a basidiomycete strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 95- 101.
- Wong, V., Dalal R., Greene R. 2009. Carbon dynamics of sodic and saline soils following

-
- gypsum and organic material additions: A laboratory incubation. Appl. Soil Ecol. 41: 29-40.
- Yuan, H., Yang, J., Chen, W. 2006. Production of alkaline materials, surfactants and enzymes by *Penicillium decumbens* strain P6 in association with lignite degradation/solubilization. Fuel 85:1378-1382.
 - Zuñiga, O., Osorio, J., Cuero, R., Peña, J. 2011. Evaluación de tecnologías para la recuperación de suelos degradados por salinidad. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin 64 (1) 5769 – 5779.